

Dissertation

Molekulare Charakterisierung muriner Noroviren – phylogenetische und antigene Eigenschaften

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. mol. med. univ. Birthe Müller

geb. am 17.04.1973 in Gütersloh

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. rer. nat. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Detlev H. Krüger

2. PD Dr. rer. nat. Eckart Schreier

3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Mai 2009

für Miriam

**...und dann nimmt uns manchmal die Angst an die Hand
und wir erleben Dinge,
die wir nicht verstehen können.**

Zusammenfassung

Das murine Norovirus ist ein neu entdecktes Mitglied der Familie *Caliciviridae*. Bislang wurden vier Virusstämme beschrieben und charakterisiert (MNV1-4). In dieser Arbeit wurde erstmals die Prävalenz von MNV bei Labormäusen in Deutschland untersucht. Daraufhin wurden die neu detektierten Virusstämme anhand ihrer morphologischen, phylogenetischen und pathogenen Eigenschaften charakterisiert.

In 55% der untersuchten 82 Kotproben wurde mittels *real-time* PCR die Ausscheidung von MNV nachgewiesen. Morphologische Untersuchungen bestätigten das Vorhandensein intakter Viruspartikel in den Proben, die auch genetisch als MNVs charakterisiert wurden. Phylogenetisch wurden die Viren in vier genetische Cluster eingruppiert, die sich sowohl untereinander als auch von den Stämmen MNV1-4 deutlich unterscheiden. Die Relevanz der Subklassifizierung von MNV wurde durch unterschiedliche Wachstumskinetiken und IFN-beta-Sensitivitäten divergenter Stämme funktional bekräftigt. Zudem konnten, basierend auf Sequenzdaten aus zwei subgenomischen Bereichen, rekombinante Virusstämme identifiziert werden. Durch Kokultivierung von MNV-Isolaten wurde homologe Rekombination von Noroviren erstmals *in vitro* simuliert.

Beobachtungen von natürlich und experimentell infizierten Mäusen zeigten, dass der Stamm MNV-M21 in den Tieren eine persistierende Infektion induziert. Serologische Untersuchungen verdeutlichten, dass die Persistenz unabhängig von einer intakten und protektiven Immunantwort stattfand. Bestimmungen der ORF2-Sequenzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion gaben Hinweise auf Antigendrift der hypervariablen P2-Domäne. Innerhalb dieser Domäne ist eine zwischen murinen und humanen Noroviren konservierte Proteinsequenz lokalisiert. Die antigenen Eigenschaften dieses Peptids wurden genauer untersucht. Generierte Antiseren zeigten Kreuzreaktivitäten gegenüber verschiedenen Norovirus-Kapsidproteinen. Zudem waren Peptidantikörper in der Lage eine MNV-Infektion *in vitro* zu neutralisieren.

Stichwörter

murines Norovirus, genetische Diversität, Rekombination, Persistenz, Antigendrift, Peptidantikörper

Abstract

The murine norovirus is a newly discovered member of the family *Caliciviridae*. So far, four strains have been described and characterised (MNV1-4). This is the first study on the prevalence of MNV among laboratory mice in Germany. Thereupon the detected new strains have been characterised considering morphologic, phylogenetic and pathogenic properties.

Using real-time PCR, shedding of MNV has been found in 55% of 82 investigated faeces samples. Morphologic investigations confirmed the presence of intact virus particles within the samples, which genetically also have been characterised as MNVs. Phylogenetically these viruses have been grouped into four genetic clusters, which could be distinguished from each other and from strains MNV1-4. Relevance of MNV subtyping has been functionally corroborated through different growth kinetics and Interferon-beta sensitivities of divergent strains. Based on subtyping in two different subgenomic regions, recombinant strains have been identified. By cocultivation of MNV isolates, homologous recombination of noroviruses *in vitro* has been simulated for the first time.

Studies of naturally and experimentally infected mice showed that strain MNV-M21 induce a persistent infection. Serological testings confirmed that the persistence occurred independently of an intact and protective immune response. Determination of ORF2 sequences at different time points of infection indicated antigenic drift of the hypervariable P2 domain. A protein sequence stretch, which is conserved between murine and human noroviruses, is located within this domain. The antigenic features of this stretch have been investigated. Generated antisera against this peptide were crossreactive with different norovirus capsid proteins and were able to neutralize MNV infection *in vitro*.

Keywords

murine norovirus, genetic diversity, recombination, persistence, antigenic drift,
peptide antibodies

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung	8
1.1 Hintergrund	8
1.1.1 Die Bedeutung viraler Gastroenteritiden	8
1.1.2 Animale Noroviren und die Entdeckung des murinen Noroviruses	10
1.2 Das murine Norovirus (MNV-1)	11
1.2.1 Pathogenese und Kultivierung	11
1.2.2 Genom und Genomaufbau	13
1.2.3 Virusreplikation	14
1.2.4 MNV-Prävalenz in Labormäusen	15
1.2.5 MNV als Modellvirus für humane Noroviren	16
1.3 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Nachweis akuter MNV-Infektionen	18
2.1.1 Untersuchungsmaterial	18
2.1.2 Probenaufarbeitung und Präparation viraler RNA	18
2.1.3 Virusdetektion und Quantifizierung (<i>real-time</i> PCR)	18
2.2 Morphologische Charakterisierung	21
2.2.1 Partikelaufreinigung und Dichtezentrifugation	21
2.2.2 Elektronenmikroskopie	22
2.3 Molekulare Epidemiologie	23
2.3.1 Erstellung von MNV-Totalsequenzen	23
2.3.2 Erstellung von Teilsequenzen verschiedener Genomregionen	27

2.3.3	Phylogenetische Analysen	30
2.3.4	Untersuchung von putativen Rekombinationsereignissen <i>in vivo</i>	31
2.3.5	SimPlot-Analysen	32
2.4	<i>In-vitro</i>-Charakterisierung	33
2.4.1	<i>In-vitro</i> -Kultivierung von MNV	33
2.4.2	<i>In-vitro</i> -Rekombination	35
2.4.3	Wachstumskinetiken	37
2.5	<i>In-vivo</i>-Charakterisierung	38
2.5.1	Persistenztestung und Infektion von Wildtyp-Mäusen	38
2.5.2	Serologie (Neutralisationstest)	38
2.5.3	Antigendrift	39
2.6	Herstellung und Charakterisierung spezifischer Antiseren	40
2.6.1	Peptidsynthese	40
2.6.2	Immunisierung von Kaninchen und Präparation der Antiseren	40
2.6.3	ELISA	41
2.6.4	Indirekte Immunfluoreszenz mit Aceton Fixierung	42
2.6.5	Westernblot	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Nachweis akuter MNV-Infektionen	45
3.1.1	MNV-Prävalenz	45
3.1.2	Morphologische Charakterisierung	49
3.1.3	Genetische Diversität muriner Noroviren	52
3.2	Nachweis homologer Rekombination bei murinen Noroviren	58
3.2.1	<i>In-vivo</i> -Rekombinationsereignisse	58
3.2.2	<i>In-vitro</i> -Rekombination	60
3.3	<i>In-vitro</i>-Charakterisierung genetisch differenter MNVs	64

3.3.1	MNV-Stämme können anhand ihrer Kinetiken unterschieden werden	64
3.3.2	Interferon-beta-Sensitivität	65
3.4	Nachweis persistierender Virusinfektionen	68
3.5	Antigendrift	71
3.6	Herstellung und Testung kreuzreaktiver Peptidantikörper	75
3.6.1	Charakterisierung einer konservierten Peptidsequenz im ORF2	75
3.6.2	Titration der Antiseren im MNV-ELISA	76
3.6.3	Peptidantiseren detektieren MNV-S99 in infizierten Zellen	77
3.6.4	Peptidantiseren im Neutralisationstest	78
3.6.5	Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber verschiedenen Norovirus Genogruppen	80
4	Diskussion	83
5	Literaturverzeichnis	92
6	Anhang	100
6.1	Abkürzungsverzeichnis	100
6.2	Abbildungsverzeichnis	104
6.3	Oligonukleotide	106
6.4	Genbanknummern der veröffentlichten Sequenzen	108
	Danksagung	109
	Lebenslauf	110
	Erklärung	112

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

1.1.1 Die Bedeutung viraler Gastroenteritiden

Der erste dokumentierte Ausbruch einer viralen Gastroenteritis, ausgelöst durch humane Noroviren, fand 1968 in Norwalk, Ohio statt (Adler, 1969). Die visuelle Darstellung und Eingruppierung des Erregers erfolgte dann 1972 mittels der Elektronenmikroskopie (Kapikian, 1972; Kapikian, 2000). Aufgrund der Nutzung sensitiver PCR-Nachweismethoden weiß man heute, dass die humanen Noroviren (NV) die Hauptverursacher infektiöser, intestinaler Erkrankungen sind. NV sind weltweit die mit Abstand häufigste Ursache (ca. 90%) von epidemischen, nichtbakteriellen infektiösen Erkrankungen. Typischerweise ist diese Infektionserkrankung mit einer signifikanten Morbidität assoziiert. Zudem ist die Mortalitätsrate in Entwicklungsländern und bei immundefizienten Patienten beträchtlich erhöht. Auch kann es bei Kleinkindern oder älteren Patienten aufgrund der starken Dehydrierung zu fatalen Verläufen kommen. In den so genannten entwickelten Ländern treten vor allem in Gemeinschaftseinrichtungen (z.B. Kindergärten, Schulen, Alten- und Pflegeheimen) oder auch in Krankenhäusern regelmäßig Ausbrüche auf. Gemeinschaftserkrankungen, bei denen Kreuzfahrtschiffe oder Flugzeugträger unter Quarantäne gestellt werden mussten, erregten in der Vergangenheit zudem ein starkes öffentliches Interesse (Sharp, 1995; Widdowson, 2002). Von großer Bedeutung sind auch die mit den hohen Zahlen an NV Infektionen verbundenen ökonomischen Verluste. So kann ein einzelner dreimonatiger Ausbruch in einem Krankenhaus Kosten von mehr als 650000 \$ verursachen (Johnston, 2007). In Deutschland sind Noroviruserkrankungen seit 2001 laut Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig. Aufgrund dieser Erhebungen lassen sich genauere statistische und epidemiologische Aussagen treffen. So kann zum Beispiel gezeigt werden, dass Noroviruserkrankungen nicht regelmäßig über das ganze Jahr verteilt gemeldet werden, sondern saisonal gehäuft in den Wintermonaten auftreten. Außerdem wird deutlich, dass in Deutschland die Anzahl der Erkrankungen und die durch NV verursachten Ausbrüche in den letzten Jahren drastisch zugenommen haben (Abbildung 1). So wurden allein in der Saison 2007 / 2008 ca. 250000 Fälle gemeldet. Internationale kollaborative Studien zeigen, dass die Zahlen der Infektionen nicht nur in Deutschland deutlich zunehmen (Lopman, 2004).

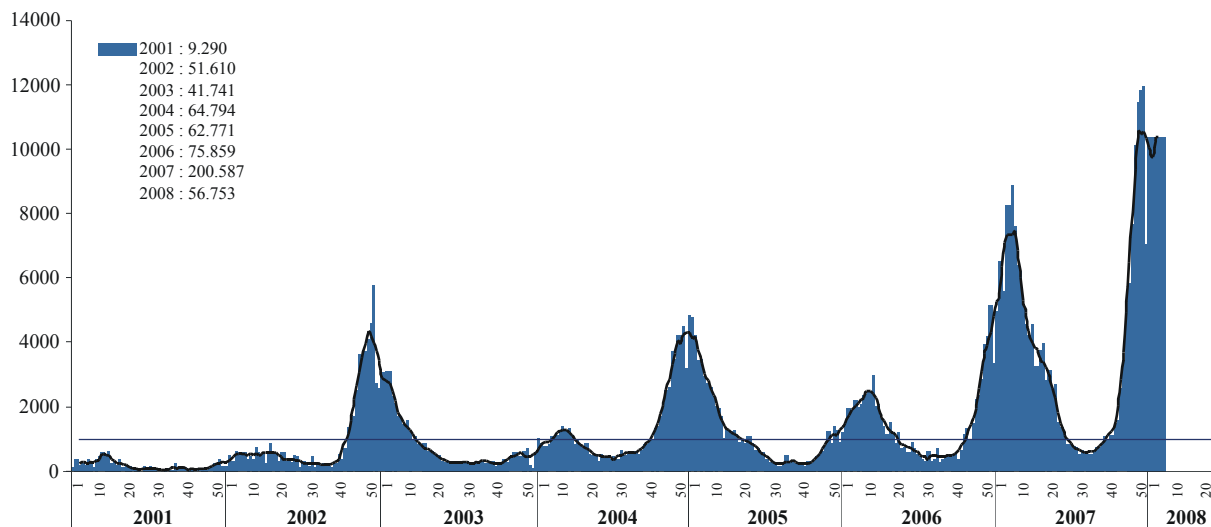


Abbildung 1: Zeitliche Darstellung gemeldeter Noroviruserkrankungen in Deutschland. Januar 2001 – Februar 2008. Quelle: Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch-Institut, Berlin.

Die äußerst umweltresistenten NV werden durch Kontakt zu infizierten Personen oder durch kontaminierte Lebensmittel beziehungsweise Oberflächen übertragen (Widdowson, 2005). Das Infektionsrisiko ist dabei sehr hoch, da die Aufnahme nur weniger Viruspartikel für eine effektive Infektion ausreichend ist. Nach relativ kurzer Inkubationszeit (12 – 24 h) treten Symptome wie (heftiges) Erbrechen und (starke) Diarrhö auf, die von Kopfschmerzen, Fieber und abdominalem Schmerz begleitet sein können. Die Krankheitsdauer beträgt durchschnittlich 2 – 3 Tage. In dieser Zeit wird das Virus fäkal oder beim Erbrechen in Form von virushaltigen Aerosolen ausgeschieden. Die fäkale Ausscheidung kann auch nach Abklingen der Symptome noch mehrere Wochen andauern. Derzeit sind keine Impfstoffe oder spezifischen Virostatika verfügbar, weswegen keine oder lediglich eine Symptom reduzierende Behandlung möglich ist. Intensive Desinfektions- und Hygienemaßnahmen sind für die Eindämmung von Ausbrüchen und die Unterbrechung von Infektionsketten das Mittel der Wahl.

Die humanen Noroviren werden aufgrund charakteristischer morphologischer und molekularbiologischer Eigenschaften in die Familie der *Caliciviridae* klassifiziert. Caliciviren sind kleine (Durchmesser 27 – 34 nm) nicht umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom in Plusstrang-Orientierung. Die Viruspartikel zeigen unter dem Elektronenmikroskop auf der Kapsidoberfläche kelchähnliche Strukturen (Kelch: griechisch: *kalyx*), was namensgebend für diese Virusfamilie ist. Laut dem Internationalen Komitee für Virustaxonomie (*International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV) gehören zu dieser Familie neben der Gattung *Norovirus* und der ebenfalls primär humanpathogenen Gattung *Sapovirus* auch zahlreiche tierpathogene Erreger, welche in die Gattungen *Vesivirus* (z.B. felines Calicivirus – FCV) und *Lagovirus* (z.B. *rabbit haemorrhagic disease virus* – RHDV) eingeordnet werden. Kürzlich wurde eine weitere, fünfte Gattung (*Nabovirus*

oder *Becovirus*) vorgeschlagen, die weitere tierpathogene Erreger (z. B. bovines *Newbury Agent 1*) beinhalten. Demnach haben Caliciviren ein breites Wirtsspektrum und verursachen unterschiedlichste Erkrankungen.

Trotz zahlreicher Versuche weltweit ist es bis heute nicht gelungen, humane Noroviren *in vitro* zu kultivieren (Duizer, 2004). Erste Arbeiten mit einem dreidimensionalen Kultursystem für Darmepithelzellen ermöglichen dabei eventuell neue Aspekte und Forschungsansätze (Straub, 2007). Auch wenn aufgrund moderner molekularer Technologien sehr viele Fragen bezüglich der Signifikanz und Epidemiologie dieser Viren beantwortet beziehungsweise untersucht werden können und zudem eventuell eine Impfstoffentwicklung ermöglichen, bleibt ein *in vitro* und/oder *in vivo* Replikationsmodell unverzichtbar. Erste Einblicke in die Pathogenese und Replikation der NV werden durch den Einsatz von infektiösen cDNA-Klonen (Estes, 2005), RNA-Replikons (Chang, 2006) oder der Möglichkeit gnotobiotische Schweine und Kälber mit humanen Viren zu infizieren (Souza, 2007; Souza, 2008) ermöglicht. Durch die rekombinante Herstellung von virusähnlichen Partikeln (VLPs) ist es zudem möglich, Untersuchungen bezüglich der antigenen Eigenschaften und Rezeptorbindungsstudien durchzuführen (Hutson, 2003; Shirato-Horikoshi, 2007). Außerdem zeigen Arbeiten mit nicht humanen Caliciviren interessante Parallelen zu NV und ermöglichen weitere Einblicke in das Verständnis dieser wichtigen humanen Pathogene. Die Identifikation vergleichbarer animaler Viren, die experimentelle Infektionsmodelle für humane Infektionskrankheiten darstellen, kann wegweisend für die Klärung der Pathogenese oder der Interaktion zwischen Virus und Wirt sein.

1.1.2 Animale Noroviren und die Entdeckung des murinen Noroviruses

In die Gattung *Norovirus* werden neben den humanen Noroviren auch zahlreiche tierpathogene Erreger eingruppiert. Aufgrund der Nutzung der Elektronenmikroskopie konnten mehrere Viren mit der typischen Morphologie von Caliciviren in Faecesproben verschiedener domestizierter Tierspezies nachgewiesen werden. So wurden Noroviren beschrieben, die Rinder (bovines Norovirus) beziehungsweise Schweine (porcines Norovirus) infizieren. Der Prototyp der porcinen Noroviren (SW918) wurde 1997 in den Ausscheidungen eines gesunden Schweins in Japan entdeckt (Sugieda, 1998). Später wurden weitere porcine Noroviren beschrieben (van der Poet, 2000; Wang, 2005). Prototypen für bovine Noroviren wurden 1978 (*Newbury Agent 2*, Woode, 1978) und in den 80ern (*Jena*, Granzow, 1985; Gunther 1987) aus den Ausscheidungen von Kälbern mit Diarrhö isoliert. Das erste Norovirus, welches Mäuse infiziert, MNV-1, wurde 2003 beschrieben (Karst, 2003). Immundefiziente Mäuse (RAG2^{-/-}/STAT1^{-/-}) erlagen sporadisch einer systemischen Erkrankung, welche durch *intracerebrale* (i.c.) Inokulation passagiert werden konnte. Phylogenetische Analysen zeigten eindeutig, dass es sich bei dem Agens um ein bis dahin unbekanntes Norovirus handelt (Abbildung 2).

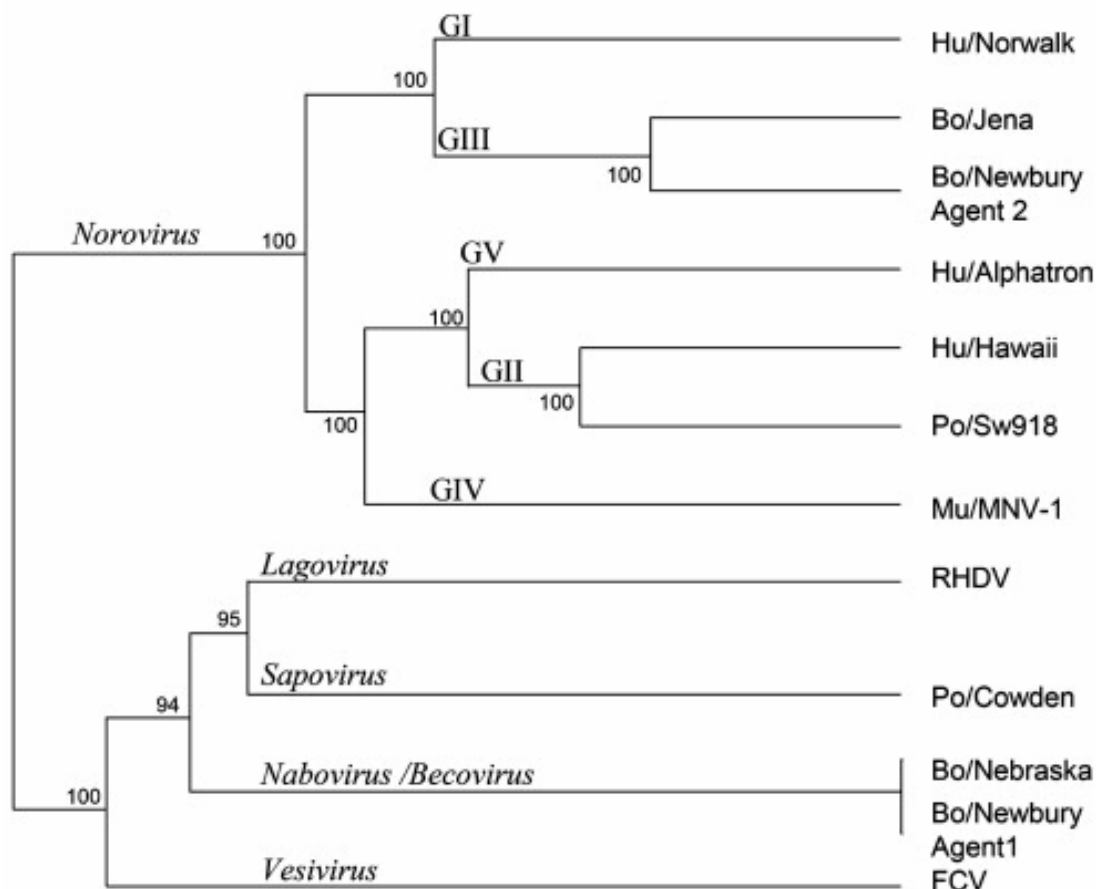


Abbildung 2: Phylogenetische Analyse der *Caliciviridae* (Scipioni, 2008). Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen der Kapsidproteine repräsentativer Vertreter der Calicivirusgattungen. Die Zahlen an den Verzweigungspunkten geben die *Bootstrap* Werte wieder. Hu: human (Mensch); Bo: bovin (Rind); Po: porcin (Schwein); Mu: murin (Maus)

1.2 Das murine Norovirus (MNV-1)

1.2.1 Pathogenese und Kultivierung

Die primäre Isolation von MNV-1 aus dem Gehirn von systemisch infizierten Mäusen entspricht nicht der intrinsischen Biologie dieses Virus. Inzwischen ist gesichert, dass es sich vielmehr um ein effektives enterisches Pathogen handelt und es konnte gezeigt werden, dass nach *per oraler* (p.o.) oder *intra nasaler* (i.n.) Gabe, sowohl immundefiziente als auch Wildtyp-Mäuse experimentell infiziert werden können (Karst, 2003). Dabei zeigte die Infektion mit MNV-1 in verschiedenen *knock-out* Mäusen einen letalen Verlauf. Diese Mäuse hatten Beeinträchtigungen ihres angeborenen Immunsystems mit den Genotypen $RAG2^{-/-}/Stat1^{-/-}$, $Stat1^{-/-}$, $Stat1^{-/-}/Pkr^{-/-}$ und $IFN\alpha\beta\gamma-R^{-/-}$ (RAG:

recombination-activating gene, STAT: *signal transducer and activator of transcription*, Pkr: Protein Kinase R, IFN-R: Interferon-Rezeptor). Die letale Infektion ist assoziiert mit Enzephalitis, Vaskulitis der zerebralen Gefäße, Meningitis, Hepatitis und Pneumonie. Dagegen zeigten Wildtyp-Mäuse auch bis zu 90 Tage nach Infektion mit MNV-1 keine erhöhte Mortalitätsrate. Ebenso ist für Mäuse mit einem Defekt im lymphozytären Immunsystem ($\text{Rag1}^{-/-}$) das Risiko einer letalen Infektion nicht signifikant erhöht. Der differente Krankheitsverlauf, in Abhängigkeit von dem entsprechenden Genotyp der infizierten Mäuse, verdeutlicht die zentrale Rolle des primären Immunsystems, insbesondere der Interferon-abhängigen antiviralen Immunantwort bei der Infektion mit MNV-1. Histopathologische Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass STAT-1 die virale Replikation im Intestinum inhibiert und zudem Virus-induzierte Apoptose intestinaler Zellen und der Splenozyten verhindert. Außerdem wird durch STAT-1 die Ausbreitung des Virus in periphere Organe (Leber und Lunge) limitiert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Ausbildung eines klinischen Erscheinungsbildes durch ein intaktes primäres Immunsystem verhindert wird (Mumphrey, 2007).

Der Verlust der T- und B-Zell vermittelten adaptiven Immunantwort trägt nicht oder nur wenig zu einem letalen Infektionsverlauf bei, wie die Infektion von $\text{Rag1}^{-/-}$ -Mäusen mit MNV-1 gezeigt hat (Karst, 2003). Allerdings entwickelten diese Mäuse eine chronisch persistierende Infektion. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Bildung antiviraler Antikörper eine wichtige Rolle bei der Neutralisation der Infektion mit MNV-1 spielt (Cachu, 2008). In der Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass durch passiven Transfer von anti-MNV-Antikörpern die Virusreplikation im Intestinum und der Milz limitiert werden kann.

Nach p.o. Infektion von $\text{STAT1}^{-/-}$ -Mäusen wurden immunhistologische Studien verschiedener Organe hinsichtlich der Anwesenheit und Lokalisation von MNV-1 Proteinen durchgeführt (Wobus, 2004). MNV-1 spezifische Färbungen konnten 2 Tage nach Infektion sowohl in der Leber, als auch in der Milz gezeigt werden. Virusproteine wurden dabei innerhalb der von-Kupffer-Sternzellen in den Sinusoiden der Leber nachgewiesen. In der Milz wurden Zellen der roten Pulpa und der Marginalzone, sowie nicht-lymphoide Zellen der weißen Pulpa angefärbt. Diese Färbungen stimmen mit der spezifischen Anfärbung von Makrophagen oder Dendritischen Zellen in der Leber beziehungsweise der Milz überein. Daraufhin konnte gezeigt werden, dass MNV-1 in kultivierten primären Makrophagen und Dendritischen Zellen repliziert. Von großer praktikabler Bedeutung ist, dass MNV-1 nicht nur in aufwendigen Primärzellkulturen sondern auch in einer monozytären Zelllinie (RAW 264.7-Zellen) kultivierbar ist. Damit ist MNV-1 das erste Norovirus, welches *in vitro* repliziert werden kann.

Analog zu den oben erläuterten Beobachtungen *in vivo*, konnte auch *in vitro* eine Regulation des Viruswachstums in Abhängigkeit von STAT-1 gezeigt werden. STAT-1 ist ein primärer Mediator sowohl des Typ I- als auch des Typ II- Interferonsystems (Platanias, 2005; Ramana, 2002). Um zu untersuchen, welches der beiden Systeme eine Rolle bei der Virusreplikation spielt, wurden

Makrophagen, isoliert aus $\text{IFN}\alpha\beta\text{-R}^{-/-}$ bzw. $\text{IFN}\gamma\text{-R}^{-/-}$ -Mäusen, mit MNV-1 infiziert. Dabei zeigte sich, dass MNV-1 in $\text{IFN}\alpha\beta\text{-R}^{-/-}$ Makrophagen eine deutlich erhöhte Replikationseffizienz, vergleichbar zu der in $\text{STAT-1}^{-/-}$ Makrophagen, aufwies. Dagegen waren die Virustiter, welche nach Infektion von Wildtyp- bzw. $\text{IFN}\gamma\text{-R}^{-/-}$ -Makrophagen gemessen wurden, vergleichsweise geringer. Demzufolge wird die STAT-1-abhängige Replikation von MNV-1 durch das Typ I- Interferonsystem gesteuert.

1.2.2 Genom und Genomaufbau

Das Genom von MNV-1 besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität (ss(+) RNA) mit einer Länge von ca. 7,4 Kilobasen (kb). Das 3'-Ende ist polyadenyliert und an das 5'-Ende ist ein virales Protein (VPg) kovalent gebunden (Abbildung 3). In den 5'-und 3'-Bereichen der genomischen RNA befinden sich kurze, nicht translatierbare Sequenzfolgen (UTRs – *untranslated regions*). Sequenzanalysen des MNV-1 Genoms identifizierten drei offene Leserahmen (ORFs – *open reading frames*), die an den Enden teilweise überlappen.

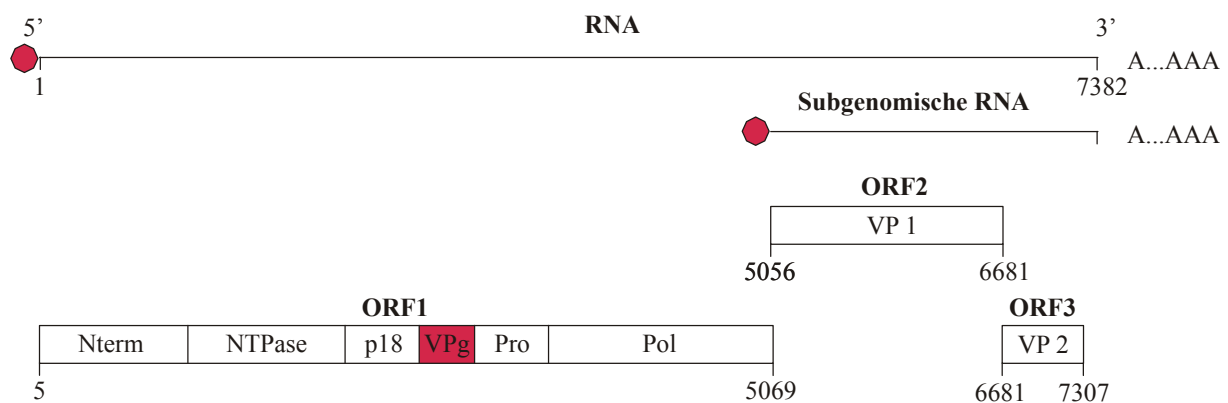


Abbildung 3: Genomorganisation von MNV-1. Die genomischen und subgenomischen RNAs sind am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende kovalent mit einem viralen Protein (VPg, rot) verbunden. ORF1 kodiert für ein Polyprotein. Nterm: N-terminales Protein, NTPase: Helikase, p18: Protein 18 kDa, VPg: *viral protein genome-linked*, Pro: Proteinase, Pol: RNA-abhängige RNA-Polymerase. ORF2 und ORF3 kodieren für die Strukturproteine VP1 (Hauptkapsidprotein) und VP2.

ORF1 kodiert für die Nichtstrukturproteine, die als Polyprotein translatiert und anschließend sequentiell proteolytisch prozessiert werden (vgl. 1.2.3).

ORF2 kodiert für das 58,9 kDa große Kapsidprotein (VP1), welches sich nach Expression in einem Baculovirus-Expressionssystem zu virusähnlichen Partikeln (VLP) zusammenfügt. Dabei bilden

jeweils zwei Kapsidproteine ein Dimer (Capsomer), wovon sich dann 90 zu einem VLP zusammenfügen. Eine Besonderheit ist, dass die VLPs eine andere Oberflächenstruktur als die nativen Viruspartikel ausbilden (Katpally, 2008). Innerhalb des Kapsidproteins können drei Domänen unterschieden werden. Zum einen ist das die S-Domäne ($S = shell$), welche die Grundstruktur des Kapsids bildet, der die beiden P-Domänen P1 und P2 ($P = protruding$) aufliegen. Die P2-Domäne bildet die eigentliche Virusoberfläche und spielt daher eine wesentliche Rolle bei der Rezeptorbindung und definiert die antigenen Eigenschaften des Virus. Während bei den VLPs die P-Domänen direkt auf der S-Domäne liegen, sind bei den nativen Viren die P-Domänen um ca. 16 Å angehoben und um ca. 40 Å im Uhrzeigersinn rotiert, was letztendlich zu einer differenten Oberflächenstruktur führt.

Der dritte Leserahmen, ORF3, kodiert für ein kleines (22,1 kDa), basisches Protein (VP2), dessen Funktion unbekannt ist. Es stellt möglicherweise ein zweites Strukturprotein dar oder könnte aufgrund seiner basischen Eigenschaften RNA-bindende Funktionen haben.

1.2.3 Virusreplikation

Die Virusreplikation findet im Zytoplasma der infizierten Zelle statt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass dies mit einer starken Änderung der Zellmorphologie und intrazellulären Organisation verbunden ist. Diese beinhaltet eine Neuordnung des Endoplasmatischen Reticulums und den Verlust eines intakten Golgi-Apparates (Wobus, 2004). In räumlicher Nähe zu den umsortierten Membranen, welche letztendlich das komplette Zytoplasma ausfüllen, findet sich eine zunehmende Zahl an Viruspartikeln. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Replikation von MNV-1 in Assoziation mit intrazellulären Membranen stattfindet. Vergleichbare Beobachtungen sind auch bei anderen ss(+)-RNA-Viren - inklusive Caliciviren - gemacht worden (Dales, 1965; Love, 1975).

Ein weiterer Aspekt der MNV-1-Replikation, der bisher genauer untersucht wurde, ist die Bildung einer subgenomischen RNA (Abbildung 3). Northern Blot Analysen der RNA, isoliert aus MNV-1 infizierten Zellen, zeigen die zeitlich zunehmende Transkription einer subgenomischen RNA (Wobus, 2004). Die subgenomische RNA entspricht dem 3'-Ende des Genoms und beinhaltet den kodierenden Bereich für das Kapsidprotein VP1 und das kleine basische Protein VP2. Die Anwesenheit dieser subgenomischen RNA lässt vermuten, dass MNV-1, wie auch andere RNA-Viren, die Synthese der Kapsidproteine durch Nutzung einer vermehrten subgenomischen Matrize und damit unabhängig von den Nichtstrukturproteinen, regulieren kann (Herbert, 1997; Meyers, 1991).

Aufgrund der positiven Polarität der RNA, kann die Translation der Virusproteine direkt nach dem Uncoating des viralen Genoms beginnen. Die Polarität entspricht der einer mRNA und daher können die viralen Proteine unter Verwendung der zellulären Translationsmaschinerie synthetisiert werden. Im Gegensatz zu zellulärer mRNA, die über eine 7-Methylguanosin-Capstruktur am 5'-Ende verfügt, sind die genomischen und die subgenomischen RNAs kovalent mit einem viralen Protein verbunden (VPg

– *viral proteine, genome-linked*; Abb.3). Interaktionsstudien zeigen, dass VPg von MNV-1 mit unterschiedlichen Proteinen der zellulären Translationsmaschinerie, vor allem dem Translationsinitiationskomplex, interagiert (Daughenbaugh, 2006). Vergleichbare Interaktionen wurden auch bei anderen Caliciviren beschrieben (Daughenbaugh, 2003; Goodfellow, 2005, Herbert 1997). Diese Studien postulieren, dass demzufolge VPg als ein Analogon der Capstruktur von mRNAs angesehen werden kann und somit eine zentrale Funktion bei der Initiation der Translation hat.

Wie bereits erwähnt, kodiert ORF1 für die so genannten Nichtstrukturproteine. Anders als die Translation, kann die Transkription der viralen RNA nicht von den zellulären Proteinen durchgeführt werden. Um das Genom zu replizieren bedarf es spezialisierter viraler Proteine. Das sind zum einen die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Pol; 57,5 kDa) und zum anderen die virale Helikase (NTPase; 39,6 kDa). Diese Enzyme katalysieren unter Verwendung des (+)-Strang-RNA-Genomes die Synthese eines komplementären (-)-RNA-Stranges, welcher als Matrize für die Neusynthese zahlreicher (+)-RNA-Genome dient. Die Synthese der Nichtstrukturproteine erfolgt über ein großes Vorläuferprotein (182,5 kDa), das posttranslational durch die virale 3C-like Proteinase (Pro; 19,2 kDa) zu den einzelnen Proteinen prozessiert wird (Sosnovtsev, 2006). Dabei erkennt die Proteinase Schnittstellen, die durch zwei benachbarte Aminosäuren charakterisiert sind, zwischen denen das Polyprotein proteolytisch gespalten wird. Dadurch entstehen sechs Einzelproteine, die nun ihre funktionale Tertiärstruktur ausbilden können. Neben den bereits genannten Proteinen werden auch ein N-terminales Protein (Nterm; 38,3 kDa) und ein kleines Protein (p18; 18,6 kDa), deren Funktionen bisher unbekannt sind, vom ORF1 kodiert. Außerdem wird das VPg (14,3 kDa), dessen Funktion zuvor erläutert wurde, durch die Prozessierung des Polyproteins gebildet.

1.2.4 MNV-Prävalenz in Labormäusen

Die Entdeckung des murinen Norovirus 1 wurde dadurch begünstigt, dass immundefiziente Mäuse aufgrund der Infektion erkrankten. Wildtyp-Mäuse (wt 129) dagegen blieben nach Inokulation mit MNV-1 asymptomatisch (Karst 2003). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass das murine Norovirus natürlicherweise in Labormäusen vorkommen könnte. Daraufhin wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika und in Kanada 12.639 Serumproben von Labormäusen gesammelt und auf das Vorhandensein von MNV-Antikörpern untersucht (Hsu, 2005). Diese Studie ergab eine Seroprävalenz von 22,1%. Aus den mesenterialen Lymphknoten von Mäusen, die zuvor positiv auf MNV-Antikörper getestet wurden, konnten dann 3 neue, genetisch unterschiedliche MNV-Isolate isoliert werden – MNV-2, MNV-3 und MNV-4 (Hsu, 2006; Hsu 2007). Nach *per oraler* Inokulation von Wildtyp-Mäusen verliefen auch die Infektionen mit diesen Viren asymptomatisch. Im Gegensatz zu MNV-1 induzierten diese MNV-Stämme dagegen eine persistierende Infektion in den Tieren.

1.2.5 MNV als Modellvirus für humane Noroviren

Die Frage, inwiefern sich das murine Norovirus als Modell für humane Noroviren eignet, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig beantworten. Zudem ist die Beantwortung der Frage abhängig von dem Aspekt der Betrachtung (Wobus, 2006). Obwohl es sich bei beiden Viren um enterale Pathogene handelt, unterscheiden sich die klinischen Bilder voneinander. Während eine Infektion mit humanen Noroviren in der Regel mit gastroenteralen Beschwerden und einem deutlichen klinischen Erscheinungsbild assoziiert ist, ist der Verlauf einer MNV-Infektion, bei intaktem Immunsystem des Wirts, asymptomatisch. Dies kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass die Virusreplikation in unterschiedlichen Zelltypen stattfindet. Während MNV einen Tropismus für Makrophagen und Dendritischen Zellen hat, werden Enterozyten als möglicher Replikationsort für NV diskutiert. Demgegenüber lassen eine identische Genomorganisation und vergleichbare Nichtstrukturproteine ähnliche Replikationsmechanismen vermuten. Ein anderer Aspekt ist die vergleichbare Morphologie der Viruspartikel, welche die Umweltresistenz der Viren bedingt. Von besonderer Bedeutung ist dieser Aspekt bei Fragen der Hygiene und der Desinfektion. Fäkale Verunreinigungen und kontaminierte Oberflächen bzw. Lebensmittel tragen entscheidend zur Verbreitung und Epidemiologie von Noroviruserkrankungen bei. Als Surrogatmarker für die Untersuchung der Stabilität und Umweltresistenz von Noroviren und deren Inaktivierung diente bisher das kultivierbare feline Calicivirus (FCV), ein respiratorisches Virus bei Katzen. Die engere genetische Verwandtschaft und die identische Transmission (fäkal-oral), deuten aber darauf hin, dass MNV weitaus besser als Surrogatmarker, zum Beispiel für die Beurteilung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln, geeignet ist (Vinje, 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können zum Verständnis der Biologie und Pathogenese der murinen Noroviren beitragen und eventuell lassen sich weitere Parallelen zu den humanen Noroviren ziehen.

1.3 Zielsetzung

Ein primäres Ziel dieser Arbeit war es, eine Aussage über die Prävalenz von murinen Noroviren in Labormäusen in Deutschland treffen zu können. Dazu sollte zunächst eine diagnostische Methode entwickelt und etabliert werden, anhand derer eine Infektion mit MNV spezifisch nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz zu der Seroprävalenzstudie in Nordamerika und Kanada sollte hier direkt der Erreger nachgewiesen werden, um einen Hinweis auf akute Infektionen zu bekommen. Ein weiteres Ziel war demzufolge die Isolation und Charakterisierung der Erreger. Hierfür sollten verschiedene virologische, molekulargenetische und immunologische Methoden angewandt werden. Die Ergebnisse sollten dabei direkt mit den bisherigen Daten zu den Stämmen MNV 1-4 verglichen werden, um die verwandtschaftlichen Beziehungen der Erreger untereinander aufzeigen zu können. Ein Aspekt der Pathogenese von murinen Noroviren ist das Auftreten von persistierenden Infektionen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Mechanismen, welche der Persistenz zugrunde liegen können, untersucht werden. Sowohl für die Entwicklung weiterer diagnostischer Methoden, als auch für die Untersuchung antigener Eigenschaften von murinen Noroviren sind spezifische Antikörper, die zuverlässig das Agens erkennen, sehr wichtig. Eine weitere Aufgabe war daher die Herstellung und Charakterisierung verschiedener MNV spezifischer Antikörper.

2 Material und Methoden

2.1 Nachweis akuter MNV-Infektionen

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Zum Nachweis der MNV-Prävalenz wurden 82 Kotproben untersucht. Diese stammten von unterschiedlichsten Mäusezuchtlinien, welche in zwei unabhängigen Einrichtungen in Berlin zu Forschungszwecken gehalten und gezüchtet werden. Zum einen wurden Proben im Max Planck Institut für Infektionsbiologie (n=52) und zum anderen im Tierstall des Robert Koch Instituts (n=30) genommen. Bei den Mäusen handelt es sich dabei um verschiedene *knock-out*, transgene und Wildtyp Linien (Tabelle 10, Ergebnisse). Die Mäuse sind in Gruppen von bis zu 10 Tieren in Isolationskäfigen mit Filterdeckeln untergebracht, die sich in Räumen der biologischen Sicherheitsstufen 2 bzw. 3 (BSL 2/3) befinden. Durch regelmäßige Untersuchungen hinsichtlich verschiedener Ektoparasiten, Endoparasiten und bekannter Mauspathogene wird eine weitestgehende Keimfreiheit der Tiere dokumentiert.

2.1.2 Probenaufarbeitung und Präparation viraler RNA

Um die virale RNA aus den Kotproben isolieren zu können, wurde zunächst von allen Proben eine 10%ige (v/v) Suspension mit 350 µl destilliertem Wasser hergestellt. Nach 20minütigem Aufschwemmen der Proben bei Raumtemperatur (RT) und anschließendem vortexen, wurden die festen Bestandteile der Suspension durch Zentrifugation (8000 UpM; 5 min; RT) abgetrennt. 140 µl der wässrigen Phase wurden zur weiteren Verarbeitung entnommen.

Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des *QIAmp Viral RNA Mini Kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstelleranweisung. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

2.1.3 Virusdetektion und Quantifizierung (*real-time* PCR)

Prinzip der *real-time* PCR

Für den primären Nachweis von MNV in den Proben wurde eine RT-PCR etabliert, die eine Quantifizierung der viralen RNA (*viral load*) in den Kotproben ermöglicht. Bei der *real-time* PCR wird die Vermehrung des PCR-Produktes durch Fluoreszenzmessung direkt während der Amplifikation analysiert (Abb. 4). Für die Detektion der PCR-Amplifikate wird eine Hydrolysierungssonde eingesetzt, die aus einem doppelt fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid besteht (mnv-TMS, Tab. 1). Diese Sonde bindet sequenzspezifisch an das PCR-Produkt und wird in jedem

Amplifikationszyklus durch die 5'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Bei der noch intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Fluorochroms am 5'-Ende der Sonde (Reporter R, FAM) von dem Fluorochrom am 3'-Ende (Quencher Q, DB) durch Energieübertragung (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) unterdrückt. Die Aufhebung der räumlichen Nähe der beiden Fluorochrome aufgrund der Hydrolysierung führt dann zu einer Zunahme der Fluoreszenz des Reporters, und zwar proportional zur Menge der PCR-Produkte. Das PCR-Produkt repräsentiert ein Sequenzabschnitt innerhalb von ORF2, welches mithilfe der Primer mnv-TM1 und mnv-TM2 (Tab. 1) amplifiziert wird. Die initiale Kopienzahl (Genomeinheiten) wird anhand einer Standardkurve berechnet. Um diese zu erstellen wird Kontroll-Plasmid-DNA (T7-MNV-1-SG-pSPORT, Quelle: Christiane Wobus, Herbert W. Virgin, Washington University, USA) über sechs Stufen (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 Kopien/ μ l) verdünnt und quantifiziert.

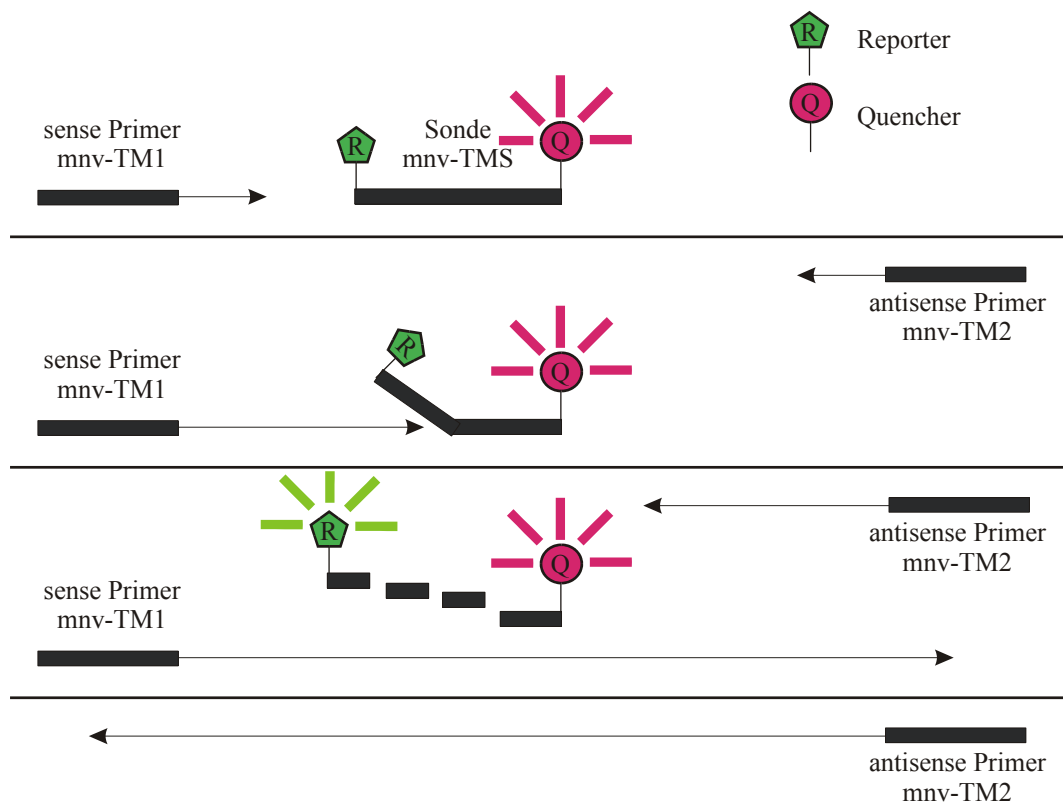


Abbildung 4: Schematische Darstellung der *real-time* PCR. Die Sonde bindet spezifisch an die Zielsequenz. Bei der intakten Sonde befinden sich Reporter (R) und Quencher (Q) in räumlicher Nähe zueinander, wodurch die Emission von R unterdrückt wird. Während der Elongationsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert diese. Nach der Hydrolyse befindet sich der Reporterfarbstoff nicht mehr in unmittelbarer Nähe zum Quencher, wodurch die emittierte Fluoreszenz nun detektiert und quantifiziert werden kann.

Durchführung der *real-time* PCR

Die quantitative RT-PCR wurde in einem *single-tube* Ansatz durchgeführt. Dabei erfolgen die Reverse Transkription der viralen RNA in die komplementäre cDNA und die anschließende *real-time* PCR in einem Reaktionsansatz. Dies wurde aufgrund der Verwendung einer Polymerase ermöglicht, welche erst im Anschluss an die cDNA-Synthese durch Hitze aktiviert wird. Bei diesem Aktivierungsschritt wird gleichzeitig die Reverse Transkriptase inaktiviert. Im weiteren Verlauf der PCR konnte die Zunahme der Fluoreszenz nach jedem Amplifikationszyklus gemessen werden, ohne dass das Reaktionsgefäß geöffnet werden musste. Hierzu wurde das *Mx3000P™ Real-Time PCR System* der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) verwendet. Durch den Einsatz der *single-tube* Reaktion wird der Zeitaufwand möglichst gering gehalten und, was sehr wichtig ist, es entfällt das Risiko einer Kontaminationen durch PCR-Produkte, die bei der diagnostischen PCR (z.B. bei der nested-PCR) eine der Hauptkontaminationsquellen sind.

Reaktionsansatz und RT-PCR Bedingungen der *real-time* PCR

<u>PCR-Ansatz (10 µl)</u>		<u><i>real-time</i> RT-PCR</u>	
Primer1: mnv-TM1 (250 nM)	0,2 µl	1. 50°C	30 min
Primer2: mnv-TM2 (250 nM)	0,2 µl	2. 95°C	15 min
Sonde: mnv-TMS (100 nM)	0,2 µl	3. 95°C	15 sek
QuantiTect RT-Mix	0,1 µl	4. 55°C	30 sek
QuantiTect Master Mix	5 µl	5. Messung der Fluoreszenz	
H ₂ O	2,3 µl	6. 45 wdh. Schritt 3. - 5.	
Probe (RNA, Standard)	2 µl		

QuantiTect RT-Mix und QuantiTect Master-Mix sind gebrauchsfertige Enzymmischungen, welche die notwendigen Salze, Puffer und dNTPs bereits enthalten (Qiagen).

Tabelle 1: Primer und Sonde für *real-time* PCR

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Lokalisation</u> <u>(nt)*</u>
mnv-TM1 sense	5'-AgA ggA ATC TAT gCg CCT gg-3'	5580-5599
mnv-TM2 antisense	5'-gAA ggC ggC CAg AgA C-3'	5653-5671
mnv-TMS	5'-6FAM-CgC CAC TCC gCA CAA ACA gCC C—DB-3'	5615-5636

FAM: 6-Carboxy-Fluorescein; DB: Dabcyl (TibMolbiol, Berlin),

*** bezogen auf Genbank-Nr: AY228235 MNV-1**

2.2 Morphologische Charakterisierung

2.2.1 Partikelaufreinigung und Dichtezentrifugation

Um einschätzen zu können, inwiefern die Quantifizierung der viralen RNA eine Aussage über das Vorhandensein von intakten Viruspartikeln zulässt, wurde von zwei Proben eine Partikelaufreinigung mit anschließender Dichtezentrifugation durchgeführt. Hierzu wurden von den entsprechenden Kotproben zunächst 2 ml einer 10%igen (v/v) Suspension in destilliertem Wasser hergestellt. Diese wurde 20 Minuten mit 5000 UpM bei 4°C zentrifugiert, um feste Bestandteile abzutrennen. 6 ml einer 30%igen (g/g) Saccharoselösung wurden dann mit der wässrigen Phase der Suspension überschichtet und anschließend 3 Stunden bei 10°C mit 30 000 UpM ultrazentrifugiert (Rotor: SW40Ti; XL-90 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter GmbH, München, Deutschland). Das Sediment, welches die gereinigten Viruspartikel enthält wurde in 300 µl PBS_o resuspendiert.

Viruspartikel haben, aufgrund ihrer Größe und ihrer Dichte, ein charakteristisches Sedimentationsverhalten in einem Dichtegradienten. Dieser Gradient wird durch Ultrazentrifugation einer Cäsiumchlorid (CsCl)-Lösung eingestellt. Dazu wurden zunächst 3,88g CsCl in 10ml destilliertem Wasser aufgelöst. Jeweils 5ml dieser Lösung wurden mit den gereinigten Viruspartikeln überschichtet und anschließend 48 Stunden bei 10°C mit 45 000 UpM ultrazentrifugiert (Rotor: SW60Ti). Der Gradient wurde dann von oben mit der Pipette in Einzelfractionen (jew. 400 µl) abgenommen. Die Dichte der Fractionen wurde mittels eines Refraktometers bestimmt, zudem wurden 140 µl der Fraction abgenommen, um die enthaltene virale RNA zu präparieren und zu quantifizieren (vgl. 2.1.2 und 2.1.3).

2.2.2 Elektronenmikroskopie

Abgesehen von molekulargenetischen Methoden kann eine familiäre Zuordnung von Viren aufgrund morphologisch unterscheidbarer Strukturkomponenten durchgeführt werden. Familientypisches Charakteristikum der nicht umhüllten (membranlosen) *Caliciviridae* sind sphärisch-ikosaedrische Kapside mit einem Durchmesser von 27 bis 34 nm, die kelchähnliche Strukturen auf der Oberfläche aufweisen. Anhand von Negativkontrastierung lassen sich Viruspartikel elektronenmikroskopisch darstellen. Dabei werden die Partikel auf einen Träger (Grid) mit hydrophiler Oberfläche adsorbiert. Anschließend wird das Grid mit einer Lösung, welche ein Metall mit sehr hoher Dichte (hier Uranyl-Acetat) enthält, gefärbt. Die Metallionen legen sich um die Partikel und, aufgrund der unterschiedlichen Dichte von Partikel und umgebenem Metall, kann die Oberfläche der Viren im Elektronenmikroskop dargestellt werden. Man spricht dabei von Negativkontrastierung, da die Viruspartikel aufgrund der geringeren Dichte, und demzufolge der besseren Durchlässigkeit für Elektronen, heller als der Untergrund erscheinen.

Als Ausgangsmaterial für die Negativkontrastierung dienten zum einen Kotsuspensionen und zum anderen einzelne Fraktionen der Dichtezentrifugation (2.2.1). Die verwendeten Grids (400 Maschen) wurden zunächst mit einem 20-40 nm dicken Plastikfilm (Polioform) beschichtet und anschließend mit einer 10-20 nm starken Kohlenstoffschicht verstärkt. Nach dem Auftropfen von ca. 20 µl des Untersuchungsmaterials auf Parafilm wurden die Grids für 10 Minuten mit der beschichteten Oberfläche auf die Tropfen gelegt, um ein Adsorbieren der Viruspartikel zu ermöglichen. Das Waschen der Grids erfolgte durch Auflegen auf mehrere Tropfen von doppelt destilliertem Wasser. Dies ist notwendig, um Phosphationen, welche die Färbung stören können, zu eliminieren. Für die abschließende Färbung wurde das Grid für ca. 10 Sekunden auf einen Tropfen einer 1%igen Uranylacetatlösung gelegt. Nach dem Entfernen von überschüssiger Lösung und dem Trocknen der Grids erfolgte die Auswertung am Transmissions Elektronenmikroskop (FEI Tecnai™).

2.3 Molekulare Epidemiologie

2.3.1 Erstellung von MNV-Totalsequenzen

RNA-Präparation

Die Präparation viraler RNA, zur Erstellung der Totalsequenzen verschiedener MNVs, erfolgte gemäß der in 2.1.2 beschriebenen Methode. Als Ausgangsmaterial wurden entweder Kotproben beziehungsweise Zellkulturüberstände nach Virusanzucht und Plaqueaufreinigung (vgl. 2.4.1) verwendet.

cDNA-Synthese

Die Umschreibung der viralen RNA in die einzelsträngige komplementäre DNA erfolgte mithilfe der PowerScriptTM Reversen Transkriptase (BD Clontech, Heidelberg, Deutschland). Der verwendete Primer (15T-aTag, Tab. 2) für die Synthese der cDNA ist komplementär zu dem poly(A)-Schwanz der viralen RNA und enthält zusätzlich eine Sequenz, welche als Primerbindungsstelle für die anschließende Genomamplifikation verwendet werden kann (Abb. 5). Für die Reaktion wurden 5µl RNA und 1µl Primer (25µM) eingesetzt. Die Synthese erfolgte entsprechend der Herstelleranweisung und wurde in einem TRIO-Thermoblock der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 2: Primer für die cDNA-Synthese

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
15T-aTag	5'-gCC AAC gAC Cgg gAg gCC AgC TTT TTT TTT TTT TTT V-3'

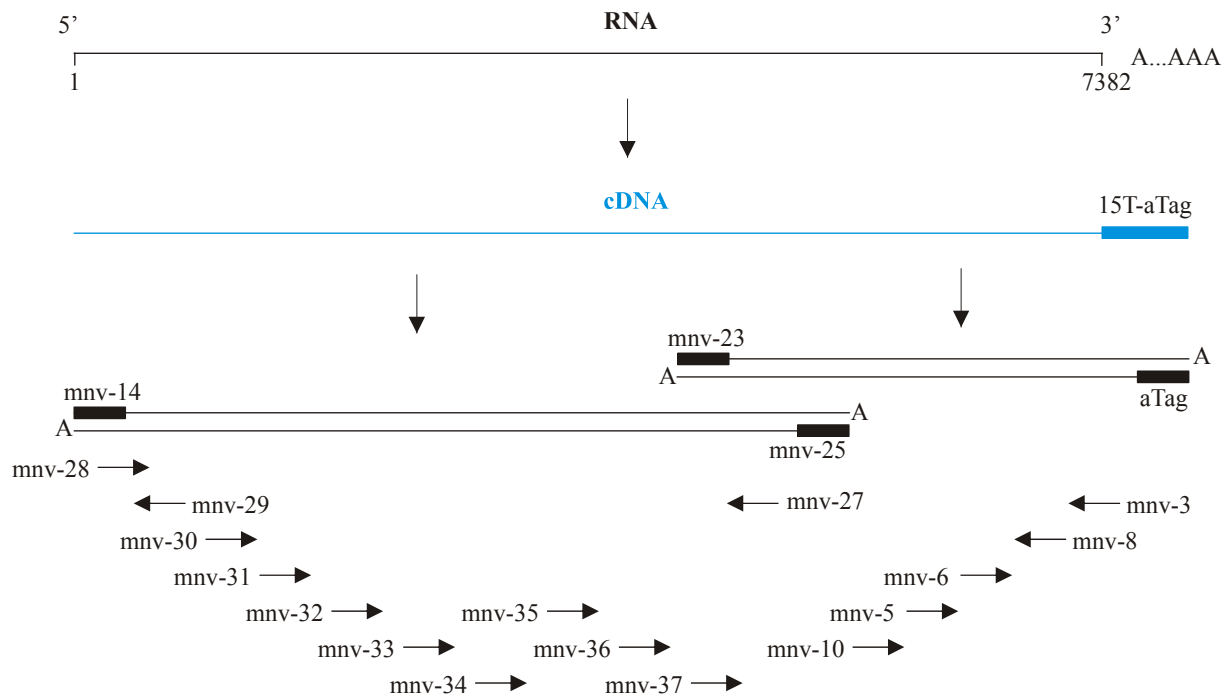


Abbildung 5: Klonierungs- und Sequenzierungsstrategie zur Erstellung von MNV-Totalsequenzen. Zunächst wurde die komplementäre und einzelsträngige cDNA unter Verwendung des Primers 15T-aTag synthetisiert. Diese diente anschließend als Matrize für die Amplifikation zweier, sich überlappender Genomfragmente. Die Fragmente wurden kloniert und mittels der angegebenen Primer sequenziert. Sequenzen der Primer und deren Lokalisation siehe Anhang (6.3).

PCR für die Klonierung von Genomfragmenten

Um die Totalsequenzen erstellen zu können, wurden zunächst zwei, sich überlappende Genomfragmente mittels PCR amplifiziert und für die anschließende Sequenzierung kloniert (Abb. 5). Aufgrund ihrer hohen Prozessivität und ausgeprägten *proof-reading* Funktion (Fehlerrate: $4,4 \times 10^{-7}$) wurde hierfür die *Phusion* DNA Polymerase der Firma Finnzymes (Espoo, Finnland) verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgten im *Tpersonal Cyclor* von Biometra. Die Elongationszeiten wurden entsprechend der Größe der zu erwartenden PCR-Produkte angepasst (ca. 30 sek / kb). Nach dem letzten Zyklus der PCR wurde zu den Reaktionsansätzen jeweils 1,5 µl TaqPolymerase (Invitex, Berlin) gegeben. Dieses Enzym addiert aufgrund seiner terminalen Transferaseaktivität ein einzelnes deoxy-Adenosin (A) an jedes 3'-Ende der doppelsträngigen DNA-Fragmente, welches eine wesentliche Rolle bei der anschließenden Insertion des jeweiligen PCR-Produktes in ein prokaryontes Plasmid spielt.

PCR-Ansatz und –Bedingungen für die Klonierung von Genomfragmenten

<u>PCR-Ansatz (50 µl)</u>		<u>PCR-Bedingungen</u>	
H ₂ O	31,20 µl	1. 98°C	45 sek
sense Primer (25 µM)	1 µl	2. 98°C	10 sek
antisense Primer (25 µM)	1 µl	3. 65°C	15 sek
dNTPs (10 mM)	1 µl	4. 72°C	1,5 – 2,5 min
5x- Phusion HF buffer	10 µl	5. 40 wdh. Schritt 2 – 4	
Phusion (2 U/µl)	0,8 µl	6. Zugabe von Taq DNA Polymerase (1,5 µl; 5U/µl)	
cDNA	5 µl	7. 72°C	10 min
		8. Abkühlung auf 4°C	

Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion der DNA

Nach der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mit 5 x DNA-Probenpuffer (25% Ficoll und 0,25% Bromphenolblau in 1x TE-Puffer) versetzt, auf ein 0,8%iges Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer aufgetragen und elektrophoretisch (90 Volt bei 5,5 V/cm Elektrodenabstand) aufgetrennt. Durch Zugabe von *Gelred* (BioTrend, Köln), einem Farbstoff, welcher mit Nukleinsäuren interkaliert, konnten die DNA Banden unter langwelligem UV-Licht (366nm) lokalisiert und ausgeschnitten werden. Die Länge der PCR-Produkte wurde anhand eines mitgeführten Längenstandards (L500; Invitrogen, Paisley, England) ermittelt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe eines Gelextraktionskits (*QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen) eluiert.

Klonierung und Sequenzierung von Genomfragmenten

Für die molekulare Klonierung der Genomfragmente in einen prokaryonten Vektor wurde der *TOPO[®] XL PCR Kloning* Kit der Firma Invitrogen verwendet. Dieser Kit ist besonders gut für die Klonierung von langen PCR-Produkten geeignet. Der linearisierte Vektor (*pCR[®]-XL-TOPO[®]*) hat an seinen 3' Enden ein einzelnes deoxy-Thymidin (3'-T) angehängt, welches dem PCR-Produkt (3'-A) eine effektive Insertion in den Vektor ermöglicht. Die TA-Klonierungsreaktion wird durch eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I (*Vaccinia*) katalysiert. Mit 1/3tel des Ligationsansatzes wurden anschließend je 30µl chemisch kompetenter *E. coli* One Shot[®] Top10 (Invitrogen) mittels Hitzeschock transformiert. Nach 1 stündiger Inkubation in 250 µl S.O.C.-Medium wurden die Bakterien auf Kanamycin-haltigen LB-Platten (0,05 mg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Um ausreichend Material für die anschließende Plasmid-Präparation zu erhalten, wurden LB-Flüssigkulturen (+ Kanamycin 0,05 mg/ml) mit Einzelkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Sedimentieren der Bakterien durch Zentrifugation (5000 UpM, 5 min) erfolgte der Aufschluss durch alkalische Lyse. Die Plasmid-DNA wurde mit dem *QIAprep Spin Miniprep* Kit der Firma Qiagen extrahiert.

Anhand von Restriktionspaltungen mit dem Enzym EcoRI wurden die Kanamycin-resistenten Klone hinsichtlich der korrekten Insertgröße untersucht. Der Verdauansatz (2 µl Plasmid-DNA, 2U EcoRI) wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (s.o.).

Plasmide, welche ein Insert mit der korrekten Länge enthielten, wurden daraufhin sequenziert. Für die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde der *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* der Firma Applied-Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um ein PCR-Kettenabbruch-System (Sanger, 1977), bei dem die zum Abbruch führenden Nukleotidderivate, 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragen. Die Analyse der Sequenz erfolgte mit einem Kapillar-Sequenziergerät (*ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems). Zur Sequenzierung wurde 1 µl der Plasmid-DNA (entspricht ca. 500 ng DNA) pro Ansatz verwendet. Nach der Reaktion erfolgte eine Gelfiltration der Proben, um nicht eingebaute Nukleotide und überschüssige Primer zu eliminieren.

Reaktionsansatz und Bedingungen für die Sequenzierung von Plasmid-DNA

<u>Reaktionsansatz (10 µl)</u>		<u>Reaktionsbedingungen</u>	
Plasmid-DNA	ca. 500ng	1. 96°C	1 min
Primer	1 pmol	2. 96°C	30 sek
<i>BigDye 3.1</i>	2 µl	3. 50°C	15 sek
5xPuffer	1 µl	4. 60°C	4 min
H ₂ O (bidest, Nukleasefrei)	ad 10 µl	5. 25 wdh. Schritt 2 - 4	
		6. Abkühlung auf 4°C	

2.3.2 Erstellung von Teilsequenzen verschiedener Genomregionen

Um die genetischen Diversitäten der Viren untersuchen zu können, ohne die Totalsequenzen aller Stämme bestimmen zu müssen, wurden Teilsequenzen aus verschiedenen Genombereichen erstellt. Dazu wurde je ein Bereich der RNA Polymerase im ORF1 (312 bp) und ein Ausschnitt des ORF2 (Kapsid, VP1, 667 bp) mittels nested PCR amplifiziert und die Amplifikate direkt sequenziert.

cDNA-Synthese

Die Umschreibung der RNA erfolgte durch eine Reverse Transkriptase (RT, *SuperscriptII*, Invitrogen), welche an den ausgewählten Primern (liefern spezifischen RNA-Abschnitt) die cDNA-Synthese startet. Für die Synthese des ORF1-Fragments wurde der Primer mnv-43 verwendet, für den Abschnitt aus ORF2 der Primer mnv-39 (siehe Anhang 6.3).

Reaktionsansatz und Bedingungen für die cDNA-Synthese

<u>Reaktionsansatz (20 µl)</u>		<u>Reaktionsbedingungen</u>	
H ₂ O	9,5 µl	1. H ₂ O, Primer und RNA zusammenpipettieren	
5 x RT-Puffer	4 µl	2. 65 °C	5 min
dNTPs (10mM)	1 µl	3. sofort auf Eis abkühlen	
DTT (0,1 M)	1 µl	4. + 5xRT-Puffer, dNTPs, DTT und RNasin	
Primer (25 µM)	1 µl	5. 25°C	2 min
RNasin (40U/µl)	0,5 µl	6. + SuperscriptII	
Superscript II (200U/µl)	0,5 µl	7. 25 C	10 min
RNA	2,5 µl	8. 42°C	50 min
		9. 70°C	15 min
		10. Abkühlung auf 4°C	

nested PCR und Sequenzierung

Bei der nested PCR handelt es sich um zwei aufeinander folgende PCRs, wobei das Produkt der ersten PCR als Matrize für die nachfolgende PCR dient. Dies erhöht zum einen die Spezifität der PCR und zum anderen wird so ausreichend Material für die Sequenzierung gewonnen.

Reaktionsansätze und Bedingungen für die nested PCR

Reaktionsansatz

1.PCR

cDNA	2,5 µl
Primer	jew. 0,4 µl
ORF1 mnv-42 s / mnv-43 as	
ORF2 mnv-10 s / mnv-39 as	
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
5x- Phusion HF buffer	4 µl
Phusion (2 U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Reaktionsansatz

2. PCR

PCR-Produkt (1.PCR)	1 µl
Primer	jew. 0,4 µl
ORF1 mnv-44 s / mnv-45 as	
ORF2 mnv-4 s / mnv-38 as	
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
5x- Phusion HF buffer	4 µl
Phusion (2 U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

PCR-Bedingungen

1. 98°C	30 sek
2. 98°C	10 sek
3. 55°C	15 sek
4. 72°C	20 sek
5. 30 wdh. Schritt 2 - 4	
6. 72°C	5 min
7. Abkühlung auf 4°C	

Im Anschluss an die 2. PCR wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt, um die PCR-Produkte bezüglich ihrer korrekten Größe, sowie dem Vorhandensein von Nebenprodukten zu überprüfen. Zudem wurde eine Einschätzung der DNA-Konzentration der PCR-Produkte anhand ihrer Bandenstärke vorgenommen. Die PCR-Produkte wurden dementsprechend verdünnt und direkt sequenziert. Als Sequenzprimer dienten dabei die Primer der 2. PCR.

Reaktionsansatz und Bedingungen für die Sequenzierung von PCR-Produkten

<u>Reaktionsansatz (10 µl)</u>		<u>Reaktionsbedingungen</u>	
PCR-Produkt	ca. 10 -20 ng	1. 96°C	1 min
Primer	1 pmol	2. 96°C	30 sek
<i>BigDye 3.1</i>	2 µl	3. 50°C	15 sek
5xPuffer	1 µl	4. 60°C	4 min
H ₂ O (bidest, Nukleasefrei)	ad 10 µl	5. 25 wdh. Schritt 2. -4.	
		6. Abkühlung auf 4°C	

2.3.3 Phylogenetische Analysen

Die phylogenetische Analyse dient der Aufklärung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen den Virusstämmen anhand von Nukleotid- oder Proteinsequenzen. Grundlage dieser Analysen sind daher Sequenzgegenüberstellungen (Alignments) mittels derer eine Distanzmatrix erstellt wird. Die graphische Darstellung solcher Verwandtschaftsbeziehungen erfolgt in Form eines Stammbaumes, bestehend aus Ästen und Verzweigungspunkten, der die Beziehung zwischen den systematischen Einheiten veranschaulicht. Dabei ist die Länge eines Astes in einem phylogenetischen Baum ein Maß für die Evolutionsrate, bzw. evolutionäre Distanz zu dem Verzweigungspunkt. Der Verzweigungspunkt stellt die evolutionäre Trennung zweier Spezies, welche sich dann unabhängig voneinander weiterentwickeln, dar.

Die Sequenzalignments und phylogenetischen Analysen in dieser Arbeit wurden mit der BioEdit-Software (Version 7.0.5; Hall, 1999), welche das *PHYLIP*-Programmpaket (Felsenstein, 1989) enthält, berechnet. Dabei wurden die evolutionären Distanzen mit der *Kimura's 2-Parameter* Methode kalkuliert (Kimura, 1980). Die ermittelten Distanzen dienten zur Erstellung der Stammbäume mittels der *Neighbor-Joining* Methode (TreeView version 1.6.6; Page, 1996). Um eine interne Kontrolle zu erhalten, wie gut der Stammbaum die verwandtschaftlichen Beziehungen wiedergibt, erfolgten Bootstrap-Analysen mit 1000 Replikaten. Dabei werden alle Positionen des Alignments in unterschiedlichen Häufigkeiten in multiplen Datensätzen analysiert. Bootstrap-Ergebnisse werden als ein Maß für die Wahrscheinlichkeit interpretiert, mit der eine phylogenetische Schätzung die wahre Phylogenetik repräsentiert. Werte über 70% werden als signifikant erachtet, d.h. wenn einzelne Virusstämme in ≥ 700 der durchgeführten Analysen in einem gemeinsamen Monophylum liegen, wird der Verzweigungspunkt als gesichert angesehen.

2.3.4 Untersuchung von putativen Rekombinationsereignissen *in vivo*

Bei der phylogenetischen Charakterisierung der Virusstämme aufgrund von Teilsequenzen aus zwei verschiedenen Genombereichen, ordnen sich verschiedene MNVs unterschiedlich in den Stammbäumen ein. Es unterscheiden sich die verwandschaftlichen Beziehungen der Viren in Abhängigkeit von dem jeweiligen Genomfragment, welches untersucht wird. Mögliche Ursachen hierfür sind z.B. Mehrfachinfektionen der Mäuse oder auch intertypische Rekombination. Um dies genauer zu untersuchen wurden nested PCRs der entsprechenden Viren durchgeführt, bei denen ein längeres Genomfragment amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt (2410 bp) beinhaltet das 3'-Ende der Polymeraseregion (ORF1) und den 5'-Bereich des Kapsids (ORF2). Analog zu 2.3.1 wurde dieses Genomfragment kloniert (TA-Klonierung) und anschließend sequenziert.

cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte gemäß der Beschreibung in 2.3.2. mithilfe der *SuperscriptII*-Reversen Transkriptase (Invitrogen). Die Umschreibung der RNA erfolgte anhand des Primers mnv-39 (siehe Anhang 6.3).

nested-PCR

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Bedingungen</u>	
<u>1.PCR</u>		<u>1.PCR</u>	
cDNA	2,5 µl	1. 98°C	45 sek
Primer	jew. 0,4 µl	2. 98°C	10 sek
mnv-42 s / mnv-39 as		3. 55°C	15 sek
dNTPs (10 mM)	0,4 µl	4. 72°C	1,5 min
5x- Phusion HF buffer	4 µl	5. 35 wdh. Schritt 2 - 4	
Phusion (2 U/µl)	0,2 µl	6. 72°C	10 min
H ₂ O	ad 20 µl	7. Abkühlung auf 4°C	

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Bedingungen</u>	
<u>2.PCR</u>		<u>2.PCR</u>	
PCR-Produkt (1.PCR)	2,5 µl	1. 98°C	45 sek
Primer	jew. 1 µl	2. 98°C	10 sek
mnv-44 s / mnv-38 as		3. 55°C	15 sek
dNTPs (10 mM)	1 µl	4. 72°C	1,5 min
5x- Phusion HF buffer	10 µl	5. 35 wdh. Schritt 2 - 4	
Phusion (2 U/µl)	0,8 µl	6. Zugabe von Taq DNA Polymerase (1,5 µl; 5U/µl)	
H ₂ O	ad 50 µl	7. 72°C	10 min
		8. Abkühlung auf 4°C	

2.3.5 SimPlot-Analysen

Eine Erweiterung der phylogenetischen Analyse, wie sie in 2.3.3 beschrieben wird, ist ein Vergleich von Sequenzen mit der SimPlot-Software. Mittels dieser Software können Sequenzen interaktiv miteinander verglichen werden (Lole, 1999). Zugrunde liegend ist ein Sequenzalignment, aus dem zunächst eine Sequenz als Referenz definiert wird. Schrittweise werden dann die anderen Sequenzen damit verglichen. Es wird dabei immer nur ein Sequenzausschnitt (Fenster) betrachtet, dessen Größe vom Anwender individuell verändert werden kann. Das Fenster wird dann entlang der Sequenz (5' → 3') verschoben, wobei die Geschwindigkeit (d.h. die Anzahl der Positionen, um die das Fenster verschoben wird) ebenfalls variabel angepasst werden kann. Auf diese Weise können Sequenzunterschiede in Bezug zu der Position innerhalb der Sequenz dargestellt werden. Die Software bietet so die Möglichkeit die relative Diversität (oder Similarität) darzustellen. Die SimPlot-Analyse findet Anwendung bei der Charakterisierung von konservierten oder variablen Genombereichen innerhalb des Sequenzalignments oder aber auch bei der Darstellung von Rekombinationsereignissen.

2.4 *In-vitro*-Charakterisierung

2.4.1 *In-vitro*-Kultivierung von MNV

Zellkulturverfahren

RAW 264.7-Zellen (Tabelle 3) wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden alle 2-3 Tage von dem Boden der Zellkulturflasche mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst und mit einer Pipette resuspendiert um die Zellen gut zu vereinzeln. Je nach Dichte wurden die Zellen 1:5 bis 1:10 mit Zellkulturmedium (DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Tab. 3) verdünnt und in neue Kulturflaschen gegeben.

Tabelle 3: Beschreibung der eukaryonten Zelllinie und deren Medienzusammensetzung

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Referenz</u>	<u>Medienzusätze</u>
RAW 264.7	ATCC® Nummer: TIB-71™ murine monozytäre Zelllinie, transformiert durch <i>Abelson murine leukemia virus</i>	Raschke, 1978	L-Glutamin (0,35 g/l) Streptomycin / Penicillin (jew. 0,1 g/l, Biochrom AG, Berlin) 10% Fötale Kälberserum (FKS, <i>Ultra Low Endotoxin</i> , PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

Infektion von RAW 264.7-Zellen

Für die Anzucht von Viren aus Probenmaterial wurde zunächst eine 10%ige Suspension (v/v) in Zellkulturmedium hergestellt. Anders als das Erhaltungsmedium (vgl. Tabelle 3) enthält das Anzuchtmedium lediglich 3% FKS. Die Suspension wurde 20 Minuten mit 5000 UpM bei 4°C zentrifugiert, um feste Bestandteile abzutrennen. Die wässrige Phase wurde abgenommen, sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) und anschließend mit Anzuchtmedium verdünnt. RAW 264.7-Zellen sind am vorherigen Tag entsprechend verdünnt und ausgesät worden, so dass sie zum Zeitpunkt der Infektion ca. 50 - 80% konfluent waren. Nach der Entnahme des Erhaltungsmediums wurden die Suspensionsverdünnungen auf die Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler. Nach einstündiger Infektion wurde der Überstand abgenommen und neues Anzuchtmedium auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Ansätze für 48h – 72h im Brutschrank inkubiert. Um die Viren zu ernten wurden die Zellen durch dreimaliges einfrieren und auftauen lysiert und anschließend für 8 Minuten bei 8000 UpM zentrifugiert. Die virushaltigen Überstände wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Erstellen von Viruspassagen

Durch passagieren des angezüchteten Virus kann analysiert werden, inwiefern sich das Virus durch die Kultivierung verändert (Adaption). Dazu wurde der virushaltige Überstand erneut zur Infektion von RAW 264.7-Zellen verwendet. Die Inkubation der infizierten Zellen erfolgte bis zum deutlichen Auftreten eines cytopathogenen Effektes oder für mindestens 48h. Anschließend wurde das Virus geerntet und wiederum für eine Infektion verwendet.

Plaquaufreinigung von MNV

Die Plaquaufreinigung erfolgte in 6-well-Platten. RAW 264.7 Zellen wurden auf eine Endkonzentration von 3×10^6 vitale Zellen / 2 ml / well verdünnt und anschließend 24 h inkubiert, um sie adhären zu lassen. Die Zellen sollten für den Plaqueassay ca. 80 -90% konfluent sein. Am nächsten Tag wurden 1/10fache Verdünnungen des Virusstocks hergestellt und die Zellen mit jeweils 0,5 ml der Virusverdünnung / well infiziert. Nach der einstündigen Inkubation wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen mit 2ml *SeaPlaque*-Agarose (1,5% in MEM-Medium, s.u.) überschichtet. Nach dem Aushärten der Agarose wurden die Platten für 48h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Um die Plaques sichtbar zu machen wurden die Ansätze nach der Inkubation mit einer weiteren Agarose überschichtet (*SeaKem*, 1,5% in MEM, s.u.), welche zusätzlich einen Farbstoff enthält, der vitale Zellen anfärbt. Nach weiteren 6 – 8 h haben die Zellen den Farbstoff aufgenommen und die nun sichtbaren Plaques konnten ausgestochen werden. Darin enthaltene Viren wurden dann weiterkultiviert.

Vorbereitung der *SeaPlaque*-Agarose:

- 1,5 g *SeaPlaque*-Agarose (Cambrex, Rockland, ME, USA) werden in 50 ml H₂O suspendiert und 15 - 20 Minuten autoklaviert beziehungsweise bereits vorbereitete ausgehärtete Agarose wieder verflüssigt und anschließend im Wasserbad auf 42°C temperiert.
- Doppelt konzentriertes MEM-Medium (2x, *Minimal Essential Medium*, 6% FKS, 2% L-Glutamin, 2% Pen/Strep, 1% Hepes) wird im Wasserbad auf 37°C temperiert.
- Am Ende der Infektionszeit werden Agarose und Medium 1:1 gemischt und die Zellen überschichtet.

Die Vorbereitung der *SeaKem*-Agarose (Cambrex) erfolgt dementsprechend, die Temperierung im Wasserbad dagegen findet bei 56°C statt. Außerdem wird der Agarose 1% *Neutral Red*-Lösung (20 g/l H₂O, Thermo Fischer Scientific Inc., Schwerte) zugesetzt.

Titration von murinen Noroviren und Titerberechnung

Die Endpunkttitration der Viren erfolgte in 96-*well*-Platten. Pro *well* wurden zunächst 1×10^4 RAW 264.7-Zellen in 100 μ l Erhaltungsmedium vorgelegt. Je Titrationsreihe wurde mit 100 μ l des Virusstocks begonnen. Die Titration wurde in Mehrfachbestimmungen durchgeführt und erfolgte in Verdünnungsstufen von 1:10 (in Anzuchtmedium). Zu den Zellen wurden jeweils 100 μ l der Virusverdünnungen zugegeben und der Ansatz für bis zu 72 h im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung der Titration erfolgte anhand der Identifikation von Plaques bzw. die vollständige Zerstörung aller Zellen in dem entsprechenden *well*. Der Fortschritt des cytopathogenen Effektes (cpe) wurde täglich mikroskopisch untersucht.

Der Titer, bezogen auf einen Milliliter, wurde wie folgt berechnet:

Reziproker Wert der letzten positiven Verdünnungsstufe x 10.

– Dabei wurde für jeden Virusstock der Mittelwert aus den Mehrfachbestimmungen ermittelt.

2.4.2 *In-vitro*-Rekombination

Kokultivierung von Virusisolaten

Anhand von Kokultivierungen zweier genetisch differenter MNV-Isolate sollte versucht werden eine intertypische (homologe) Rekombination *in vitro* zu simulieren. Zunächst wurden die Virusstocks der Isolate (M21 und S99) titriert, die anschließende Kultivierung erfolgte in 6-*well*-Platten. RAW 264.7-Zellen wurden auf eine Endkonzentration von 3×10^6 vitale Zellen / 2 ml / *well* verdünnt und anschließend 24 h inkubiert, um sie adhären zu lassen. Für die Infektion wurden die Virusstocks in Anzuchtmedium verdünnt (M21: $100 \times \text{ID}_{50}$ / ml; S99: $10 \times \text{ID}_{50}$ / ml) und die Zellen mit jeweils 2 x 0,25 ml Virusverdünnung / *well* bei RT auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nach 1 h wurden die Überstände abgenommen und frisches Anzuchtmedium auf die Zellen gegeben, anschließend erfolgte die Inkubation der Platten für 24 h im Brutschrank. Um die Viren zu ernten wurden die Zellen durch dreimaliges einfrieren und auftauen lysiert und anschließend für 8 Minuten bei 8000 UpM zentrifugiert. Aus 140 μ l der wässrigen Phase wurde die virale RNA präpariert anhand derer eine Charakterisierung der Isolate durchgeführt wurde.

Rekombinations-PCR

Um Rekombinationsereignisse nachweisen und charakterisieren zu können wurde eine hyperspezifische PCR etabliert, welche durch selektive Amplifikation der rekombinanten Genome deren Darstellung und Typisierung ermöglicht. Anhand von Sequenzalignments der Ursprungsisolat (P-Generation: M21 und S99) wurden zunächst Primerbindungsstellen identifiziert, welche sich in besonders variablen Bereichen der Genome befinden und daher ein isolatspezifisches Primerdesign

möglich machten. Ein weiterer Anspruch an die spezifischen Primer waren hohe Schmelztemperaturen, wodurch hohe Annealingtemperaturen ermöglicht wurden, was die Spezifität der PCR zusätzlich verbesserte. Analog zu 2.3.1 wurde zunächst die einzelsträngige cDNA anhand des Primers 15T-aTag durch die *BD-Powerscript* Reversen Transkriptase synthetisiert. Um die Virusisolate zu charakterisieren wurden anschließend 4 verschiedene PCRs parallel durchgeführt. Während PCR1 und PCR2 spezifisch für die P-Generation sind, werden mittels PCR3 bzw. PCR4 die putativen Rekombinanten (F1-Generation) amplifiziert. Die Auswertung der spezifischen PCRs erfolgte mithilfe der Gelelektrophorese. Um die Ergebnisse der Rekombinations-PCR zu bestätigen wurden die PCR-Produkte der F1-Generation kloniert (TA-Klonierung) und anschließend sequenziert. Detaillierte Untersuchungen der verschiedenen Virusisolate erfolgten dann mittels der SimPlot-Software (vgl. 2.3.4 und 2.3.5).

Reaktionsansätze und Bedingungen für die Rekombinations-PCR

<u>PCR-Ansatz (20 µl)</u>		<u>PCR-Bedingungen</u>	
H ₂ O	12,50 µl	1. 98°C	30 sek
sense Primer (25 µM)	0,4 µl	2. 98°C	10 sek
antisense Primer (25 µM)	0,4 µl	3. 72°C	45 sek
dNTPs (10 mM)	0,4 µl	4. 30 wdh. Schritt 2 – 3	
5x- Phusion HF buffer	4 µl	5. 72°C	10 min
Phusion (2 U/µl)	0,32 µl	6. Abkühlung auf 4°C	
cDNA	2 µl		

Primerkombinationen der spezifischen PCRs und Produktgröße

PCR 1	M21 s	M21 as	1356 bp
PCR 2	S99 s	S99 as	1786 bp
PCR 3	M21 s	S99 as	1618 bp
PCR 4	S99 s	M21 as	1524 bp

Tabelle 4: Primer für die Rekombinations-PCR

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Lokalisation (nt)</u>
M21 s	5'-CTg CgC AAT ggT TgA ggT gAC gCg ggT C-3'	4499-4526
M21 as	5'-CCA TTC TgC CAT Tgg ggg TTA gCC ggg-3'	5829-5855
S99 s	5'-ggT gCg CCT TTC CCC CgA ACC ggA AC-3'	4331-4356
S99 as	5'-ggT ggT CAC CTT gAg TTT gTC ACC CgC C-3'	6090-6117

2.4.3 Wachstumskinetiken

Als ein weiteres, putatives Unterscheidungskriterium genetisch differenter Virusstämme sollte deren Replikationsverhalten *in vitro* untersucht werden. Um eine Aussage über die Replikationseffizienzen der Viren zu erhalten, wurden die Wachstumskinetiken der Isolate M21, S99 und des Referenzvirus MNV-1 bestimmt. Zudem wurde die Abhängigkeit der Replikation der Viren von IFN β , sprich die Sensitivität der Isolate gegenüber einem zellulären antiviralen Wirkstoff, untersucht. Zunächst wurden die Virusisolate auf RAW 264.7-Zellen kultiviert und Virusstocks hergestellt. Anschließend wurden die Konzentrationen der Stocks mittels Titration ermittelt (vgl. 2.4.1). Die Bestimmung der Wachstumskinetiken wurde mit denjenigen Viruskonzentrationen durchgeführt, die bei der Titration der letzten positiven Verdünnungsstufe entsprachen. So wurde der Virusstock MNV-1 1:10⁵, S99 1:5x10³ und M21 1:10³ verdünnt. Durchgeführt wurden die Infektionen in 4-*well* Platten, die 24 h zuvor mit RAW 264.7-Zellen beschichtet wurden und zum Zeitpunkt der Infektion ca. 80% konfluent bewachsen waren. Zum Zeitpunkt –1 h wurden in alle 4 *wells* der Platten 200 μ l der Virusverdünnung gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Insgesamt wurden pro Isolat 7 Platten infiziert, eine für jeden Zeitpunkt, an dem die Virusreplikation bestimmt werden sollte (1, 6, 12, 18, 24, 30 und 36 h). Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Virusverdünnungen von den Zellen abgenommen und jeweils 500 μ l Anzuchtmedium auf die Zellen gegeben. Während in einem *well* das Medium keine weiteren Zusätze enthielt, wurde in die anderen *wells* verschiedene Konzentrationen rekombinant hergestelltes IFN β zugegeben (1, 10 und 25 U / ml; PBL InterferonSource, NJ, USA). Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten bei 37 °C im Brutschrank. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Viren geerntet und die Konzentration der Genomäquivalente als Maß für die Virusreplikation mittels quantitativer *real-time* PCR bestimmt.

2.5 *In-vivo*-Charakterisierung

2.5.1 Persistenztestung und Infektion von Wildtyp-Mäusen

Um die Dauer der Virusausscheidung einzelner Mäuse untersuchen zu können, wurden 4 IFN γ -RI^{-/-}-Mäuse aus einer Gruppe mit positivem diagnostischem Befund herausgenommen und in Einzelkäfigen untergebracht. Mittels *real-time* PCR wurde die Virusausscheidung bei allen 4 Tieren bestätigt und anschließend über einen Zeitraum von 110 Tagen in regelmäßigen Abständen überprüft (vgl. 2.1). Parallel dazu erfolgte die phylogenetische Charakterisierung der Viren.

Zudem sollte der Verlauf einer Infektion mit dem Isolat M21 in Wildtyp-Mäusen untersucht werden. Dazu wurden 4 *Black6*-Mäuse (Bl6) zunächst auf ihre Virusfreiheit hin untersucht. Anschließend wurde den Tieren jeweils 200 μ l einer aufgereinigten Virussuspension (MOI von 100; *multiplicity of infection*) in PBS *per os* appliziert. In den ersten 7 Tagen nach der Inokulation wurden täglich, dann weiterhin in regelmäßigen Abständen, Kotproben von den Tieren entnommen und der Infektionsverlauf mittels *real-time* PCR untersucht. Die Virusausscheidung wurde über einen Zeitraum von insgesamt 73 Tagen überprüft.

2.5.2 Serologie (Neutralisationstest)

Anhand von Neutralisationstests sollte untersucht werden, ob sich im Rahmen einer Infektion MNV-spezifische Antikörper im Wirt gebildet haben. Dazu wurde den Wildtyp-Mäusen, vor und 21 Tage nach der Inokulation mit dem Isolat M21, Blut abgenommen und daraus das Serum gewonnen. Zunächst wurden die Seren 1:30 in PBS *per os* verdünnt und anschließend sterilfiltriert (Porengröße 0,22 μ m). Die Durchführung der Neutralisationstests erfolgte in 96-*well*-Platten, in denen zunächst Titrationsreihen der Seren pipettiert wurden, wobei Mehrfachbestimmungen der Seren durchgeführt wurden. Für die erste Verdünnungsstufe wurden 25 μ l Serum mit 75 μ l Anzuchtmedium in einem *well* verdünnt. Aus diesem *well* wurden 50 μ l entnommen und dann weiter mit 50 μ l Anzuchtmedium verdünnt. Dieser Verdünnungsschritt wurde noch 8mal wiederholt. Pro *well* wurden 50 μ l einer Virusverdünnung (MNV-S99-P16 1:10⁴) zu den Serumverdünnungen gegeben und anschließend für 3 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden dann 1 x 10⁴ RAW 264.7-Zellen in 100 μ l Erhaltungsmedium pro *well* zugegeben und die Platten dann für bis zu 72 h im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung der Neutralisationstests erfolgte visuell anhand der Ausbildung von Plaques bzw. der vollständige Zerstörung der Zellen in den Ansätzen. Sind neutralisierende Antikörper vorhanden, wird eine Infektion und damit die Lyse der Zellen verhindert. Der Fortschritt des cytopathogenen Effektes wurde täglich mikroskopisch untersucht.

2.5.3 Antigendrift

Zur Untersuchung der genetischen Stabilität der Viren, im Verlauf einer persistierenden Infektion, wurden die ORF2 Sequenzen der ausgeschiedenen Viren zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und miteinander verglichen. Dazu wurden aus Kotproben, die im Abstand von 110 Tagen (IFN γ -RI^{-/-}-Mäuse) bzw. 70 Tagen (Wildtyp-Mäuse) entnommen wurden, die viralen Genome isoliert. Analog zu 2.3.1 wurden die einzelsträngige cDNAs synthetisiert und anschließend die ORF2-Sequenzen mittels nested PCR amplifiziert. Die PCRs wurden, wie in 2.3.4 beschrieben durchgeführt. Primer der 1.PCR waren mnv-21 und aTag, die der 2. PCR mnv-23 und mnv-8 (siehe Anhang 6.3). Nach der Insertion der PCR-Produkte in einen prokaryonten Vektor (TA-Klonierung) wurden von jeweils 5 Klonen Plasmid-DNA präpariert und anschließend sequenziert. Zusätzlich zu den phylogenetischen Analysen wurde auch die Entropie der ORF2-Proteinsequenz ermittelt. Dazu wurden die Sequenzalignments zunächst in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt und anschließend mithilfe der BioEdit-Software die Entropie des Kapsidproteins berechnet.

2.6 Herstellung und Charakterisierung spezifischer Antiseren

2.6.1 Peptidsynthese

Die Synthese der Peptide (Tabelle 5) wurde von Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie der Charité in Berlin, durchgeführt. Die Peptide wurden mittels Festphasensynthese hergestellt und nach Abtrennung von der Festphase (Harz) lyophilisiert. Nach Vor- und Nachreinigung mittels *reversed phase* Chromatographie (HPLC) wurden die Peptide durch Massenspektrometrie auf Reinheit und Homogenität überprüft. Zur Steigerung der Immunogenität wurden die Peptide N-terminal über ein zusätzlich eingebautes Cystein an KLH (*keyhole limpets hemocyanin*) gekoppelt.

Tabelle 5: Beschreibung der Peptide für die Immunisierung von Kaninchen

<u>Name / Bezeichnung</u>	<u>Peptidsequenz (AS)</u>
P-NV / humanes Norovirus (GII.4)	(NH ₂)-YDPTEEIPAPLGTPDFVGKI-(COOH)
P-MNV1 / murines Norovirus lang	(NH ₂)-AYVPGDRAAPLGYPDFSGQL-(COOH)
P-MNV2 / murines Norovirus kurz	(NH ₂)-GDRAAPLGYPDFSGQ-(COOH)

2.6.2 Immunisierung von Kaninchen und Präparation der Antiseren

Zur Herstellung spezifischer Antiseren wurden Kaninchen mit dem entsprechenden Antigen immunisiert. Die Immunisierungen und die Testungen der Antiseren wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Seramun Diagnostica GmbH durchgeführt. Zum einen wurden die Tiere mit MNV-S99 und zum anderen mit den synthetisch hergestellten Peptiden immunisiert. Dabei wurden für die Grundimmunisierung jew. 800 µl Antigen in PBS (enthält 1 mg MNV-S99 bzw. 0,8 mg Peptid-KLH) mit 800 µl komplettem Freundschens Adjuvants gemischt und anschließend *subcutan* appliziert. Nach 4 Wochen folgten dann in 8-tägigen Abständen insgesamt 3 Boosterinjektionen. Für die Boosterinjektion mit MNV-S99 wurden jeweils 500, 250 und 100 µg in 800 µl PBS mit gleichem Volumen inkomplettes Freundsches Adjuvants gemischt und appliziert. Die Boosterinjektionen mit Peptid-KLH erfolgten mit jeweils 0,5 mg in 500 µl PBS + 500 µl inkompletten Freundschens Adjuvants. Aus einer Ohrvene wurde den Tieren vor der Grundimmunisierung (Präimmunserum), 8 Tage nach der dritten Boosterinjektion (Hyperimmunserum I) und nach weiteren 4 Wochen (Hyperimmunserum II) Blut abgenommen. Die gewonnenen Antiseren wurden anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.6.3 ELISA

Zur Überprüfung der Immunantwort wurden Titrationen der Antiseren im Festphasen-ELISA durchgeführt. Dabei wurden die Reaktivitäten der Antikörper gegenüber MNV und auf verschiedene NV-Kapsidproteine (Tabelle 6) getestet. Zunächst wurden Mikrotitrationsplatten mit hochbindenden Oberflächeneigenschaften (Nunc Maxisorp) mit MNV-S99 bzw. den zu untersuchenden Proteinen beschichtet. Dazu wurden die Virussuspension und die Proteine zunächst in einem 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,5) auf eine Konzentration von 10 µg / ml eingestellt. Die Adsorption erfolgte über einen Zeitraum von 24 Std. bei 2-8 °C (100µl / well). Nach der Beschichtung wurde die Lösung aus den Platten abgesaugt, einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend kräftig auf Zellstoff ausgeschlagen, um Restflüssigkeit zu entfernen. Für die Titration der Seren wurden Verdünnungen ($1:10^3$ bis $1:10^6$) in einem Verdünnungspuffer (HP-060, Seramun) angesetzt. Die beschichteten Platten wurden mit 100 µl Verdünnung / well für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 5mal mit Waschpuffer (HP-025, Seramun) gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Schaf-anti-Kaninchen-POD, Seramun) in einer Konzentration von 1,0 µg / ml (100 µl / well, 60 min, 37°C). Nach einem weiteren Waschschritt wurden 100 µl Chromogen-Substratlösung (TMB-H₂O₂) / well pipettiert (SeramunBlau® fast) und für 5 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Durch Zugabe von 0,25 M H₂SO₄ wurde die Reaktion gestoppt und die Extinktionen in einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen.

Tabelle 6: Bei den Festphasen-ELISAs verwendete NV-Kapsidproteine

<u>Genogruppe</u>	<u>Virusstamm</u>	<u>Expressionssystem</u>
GI.1	Norwalk	Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit
GII.4	Grimbsby neu	Expression in <i>E.coli</i> BL21 (Invitrogen)
GII.7	Leeds	BaculoDirect™ Baculovirus (Gateway, Invitrogen) Expression in High Five™ Zellen (Invitrogen)

2.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz mit Aceton Fixierung

Anhand der indirekten Immunfluoreszenz MNV-infizierter Kulturzellen wurde die Reaktivität der Peptid-Antiseren auf native Viren im Rahmen einer Infektion untersucht. Dazu wurden RAW 264.7-Zellen mit einer MOI von 100 mit dem Isolat S99 infiziert (vgl. 2.4.1.) und über Nacht inkubiert. Zunächst wurden die Zellen mit 1 ml PBS_o gewaschen, anschließend mit einem Aceton/Methanol Gemisch (25:75) für mindestens 15 Minuten bei -20°C fixiert. Danach wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen bei Raumtemperatur angetrocknet. Um unspezifische Bindungen zu minimieren wurden die Zellen mit 1% BSA (g/v) in PBS_o für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Diese Blockierlösung wurde zudem für die Verdünnungen der Antiseren verwendet. Zur eigentlichen Antikörperbindung wurden die verdünnten Peptidantikörper (1:100) auf die fixierten Zellen aufgebracht und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS_o gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten sekundären Antikörper (Tabelle 7) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. In einem Kontrollansatz erfolgte die alleinige Färbung mit dem sekundären Antikörper, um auszuschließen, dass dieser eine Kreuzreaktivität gegenüber zellulärer oder viraler Proteine hat. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS_o wurden die Zellen mit Vectashield[®] mit Dapi (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) unter Deckgläsern eingebettet. Dapi ist ein Farbstoff, der mit DNA interagiert und so eine Darstellung von Zellkernen ermöglicht. Nach einer Trockenzeit von mindestens 6 Stunden erfolgte die Spezifizierung unter dem Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Göttingen, Deutschland) bei UV-Licht. Die Aufnahmen wurden mit einer digitalen Kamera gemacht und mit dem Programm AxioVision 3.1.2.1 (Carl Zeiss Vision GmbH) bearbeitet.

Tabelle 7: Bei der Immunfluoreszenz verwendeter sekundärer Antikörper

<u>Antikörper (Verdünnung)</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Firma</u>
anti-Kaninchen-IgG (FITC-Konjugat; 1:50)	Ziege	Sigma, St. Louis, MO, USA

FITC: Fluorescein-5-Isothiocyanat

2.6.5 Westernblot

Tabelle 8: Bei dem Westernblot verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

2 x Probenpuffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerol; Bromphenolblau
Proteingel-Laufpuffer	25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 10 % SDS
Semi-dry Blotpuffer	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 1,3 mM SDS; 20 % Methanol
10 x TBS-T Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,5 M NaCl; 0,5 % Tween20

Um die Kreuzreaktivitäten der Peptidantikörper gegenüber verschiedenen humanen und murinen Kapsidproteinen zu überprüfen, wurden die Antiseren im Immunoblot getestet. Es wurden die Reaktivitäten der Seren gegen verschiedene rekombinant hergestellte Kapsidproteine (NV-GI.1, -GI.6, -GII.4 und -GII.7, Tab. 9) und gegen das Kapsidprotein von dem Isolat MNV-S99 getestet. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch auf einem 10 %igen SDS-Proteingel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dazu wurden je 500 ng Protein mit gleichem Volumen Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein 2schichtiges SDS-Proteingel (5%iges Sammelgel, 10%iges Trenngel) aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard diente ein Gemisch aus gefärbten Proteinen definierter Größe (BenchMark™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen). Nach dem Gellauf (25 mA / Gel; 1,5 h) wurden die Proteine mittels Elektrotransfer mit einer Peqlab-Blot-Apparatur nach dem *Semi-dry*-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) mit der Porengröße von 0,2 µm übertragen. Es wurde pro Membran mit 50 mA für 2 h mit Semi-dry-Puffer als Transfer-Flüssigkeit transferiert. Zur Absättigung unspezifischer, freier Bindestellen wurde die Membran anschließend über Nacht bei 4°C in Block-Lösung (5 % Magermilchpulver in 1xTBS-T, g/v) inkubiert. Vor der Inkubation mit den Antiseren wurde die Membran kurz in 1xTBS-T gewaschen. Um die Reaktivität der Antiseren zu testen wurden diese 1:2000 in 1xTBS-T verdünnt und die Membranen mit den Verdünnungen für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit 1xTBS-T für 30 min bei mehrfachem Pufferwechsel gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-IgG POD, Sigma), welcher 1:10000 in 1xTBS-T verdünnt wurde, für 30 min bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift wurden über die Meerrettichperoxidase vermittelte Chemolumineszenz mit einer Substrat-Lösung (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, POD, Amersham) die jeweiligen Proteine detektiert. Dazu erfolgte für variable Zeiträume die Exposition gegen Röntgenfilme (Kodak BioMax MR Film).

Tabelle 9: Bei den Immunoblots verwendete NV-Kapsidproteine

<u>Genogruppe</u>	<u>Virusstamm</u>	<u>Expressionssystem</u>
GI.1	Norwalk	BaculoDirect™ Baculovirus (Gateway, Invitrogen) Vektor: BaculoDirect c-Term linear DNA Expression in High Five™ Zellen (Invitrogen)
GI.6	Mikkeli	
GII.4	Grimbsby neu	
GII.7	Leeds	

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis akuter MNV-Infektionen

3.1.1 MNV-Prävalenz

Das murine Norovirus ist ein enterales Pathogen, welches während einer akuten Infektion vom Wirt fäkal ausgeschieden wird. Der diagnostische Ansatz war daher der eindeutige Nachweis des infektiösen Agens in Kotproben von Labormäusen, um aktuell stattfindende Infektionen zu erkennen. Für den Erregernachweis wurde zunächst eine quantitative PCR etabliert, die zusätzlich zu dem Befund eine Aussage über die Menge der ausgeschiedenen Viren im Rahmen einer Infektion ermöglicht (*viral load*). Es wurden Proben in zwei Tierställen in Berlin (Max Planck Institut für Infektionsbiologie - MPI, Marienfelde sowie Robert Koch Institut - RKI, Wedding) gesammelt und untersucht. Die Auswahl der Proben war dabei rein zufällig, da keines der Tiere Krankheitssymptome oder ein pathologisches Verhalten zeigte. Ebenso waren die gesammelten Proben augenscheinlich ohne Befund (d.h. keine Diarrhö, Blut oder Fremdkörper im Kot). Untersucht wurden insgesamt 82 Proben, welche von 29 verschiedenen Mauszuchtlinien stammten. Bei den Zuchten handelt es sich um unterschiedliche *knock-out*, transgene und Wildtyp Mauslinien (Tabelle 10). Die Mäuse werden gruppenweise (1-10 Tiere) in Isolationskäfigen gehalten und regelmäßige Untersuchungen der Tiere, hinsichtlich bekannter bakterieller und viraler Mauspathogene sowie verschiedenen Pilzen, zertifiziert die Zuchten als Keimfrei. Zudem wird das Trinkwasser, Futter und Einstreu autoklaviert bzw. gamma-sterilisiert.

Zunächst wurde von den Kotproben eine 10%ige Suspension hergestellt und anschließend die festen Bestandteile der Suspension durch Zentrifugation abgetrennt. Aus 140 µl der wässrigen Phase wurde die virale RNA präpariert, welche dann mittels der *real-time* PCR detektiert und quantifiziert wurde. Aufgrund der Verwendung spezialisierter Enzyme konnten dabei die Reverse-Transkription und die anschließende PCR in einem Ansatz durchgeführt werden (*single-tube*). Bei der PCR wurde ein 92 bp langes Fragment aus dem konservierten Bereich des ORF2 amplifiziert (Lokalisation nt 5579 – 5671, bezogen auf MNV-1, Genbank-Nr. AY228235). Aufgrund der Quantifizierung der Amplifikate kann eine Aussage über den *viral load* der Proben gemacht werden. Die Zuordnung der Proben zu den entsprechenden Mauszuchtlinien und die Ergebnisse der *real-time* PCR sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Probenliste mit Beschreibung der Mausechtlinien und den Ergebnissen aus der *real-time* PCR

	Proben- Nr.	Mauslinie (Genotyp)	<i>real-time</i> PCR	
			+/n	<i>viral load</i> GE / ml
Max Planck	S1 – S4	IFNα/β-R^{-/-}	4/4	6,6 x 10 ⁶
Institut (MPI)	S5 – S9, S33, S34	IFNγ-RI^{-/-}	5/7	2,4 x 10 ⁷
	S10, S11	Myd 88^{-/-}	2/2	6,8 x 10 ⁶
	S12, S13	β -TCR ^{-/-}	0/2	
	S14, S15, S35, S36	RAG1^{-/-}	4/4	2,6 x 10 ⁸
	S16 – S20	RAG2/ γ Kette ^{-/-}	0/5	
	S21 – S24	TLR-2 ^{-/-}	0/4	
	S25 – S28	TLR-4^{-/-}	3/4	2,2 x 10 ⁷
	S29 – S32	TLR 2/4^{-/-}	4/4	1,2 x 10 ⁸
	S37, S38	CD1 wt	2/2	1,7 x 10 ⁶
	S62, S63	129 Casp^{-/-}	1/2	1,7 x 10 ⁷
	S64, S65	II 18/1β^{-/-}	2/2	1,5 x 10 ⁵
	S66, S67	B6 Casp ^{-/-}	0/2	
	S101, S102	C57B6/6J-Tyr wt	1/2	1,2 x 10 ⁶
	S104 – S109	SCID	3/6	1,2 x 10 ⁴
			31/52	

	Proben- Nr.	Mauslinie (Genotyp)	<i>real-time</i> PCR	
			+/n	<i>viral load</i> GE / ml
Robert Koch	S71, S72, S81, S82	Bl6 wt	0/4	
Institut (RKI)	S73, S74	Galectin 3^{-/-}	2/2	2,1 x 10 ⁸
	S75, S76	CD36^{-/-}	2/2	5,9 x 10 ⁷
	S77, S78	SRA^{-/-}	2/2	1,7 x 10 ⁷
	S79, S80	CD36/SRA ^{-/-}	0/2	
	S83, S84	CCL3 ^{-/-}	0/2	
	S85, S86	LFA ^{-/-}	0/2	
	S87, S88	LyZ ^{-/-}	0/2	
	S89, S90	GFAP-BLC tg	2/2	7,4 x 10 ⁶
	S91, S92	CAST tg	1/2	2,8 x 10 ⁷
	S93, S94	ITAC (A)^{-/-}	2/2	4,7 x 10 ⁷
	S95, S96	PSEN tg	0/2	
	S97, S98	ITAC (B)^{-/-}	1/2	5,9 x 10 ⁶
	S99, S100	YFPH tg	2/2	9,2 x 10 ⁷
			14/30	

Angegeben sind die Probenbezeichnung (S), die Zuordnung zu der entsprechenden Mauslinie und die Anzahl der Proben mit positiven Befund innerhalb dieser Zuchtlinie (+/n). Zusätzlich ist der *viral load* der Proben angegeben (Genomäquivalente GE / ml). Wurden mehrere Proben innerhalb einer Zuchtlinie positiv getestet ist der *viral load* als Mittelwert angegeben.

Insgesamt wurden 45 der 82 Proben positiv auf MNV getestet, was ca. 55% entspricht. Dabei sind aus dem MPI 31 von 52 (59,6%) und aus dem RKI 14 von 30 (46,7%) Proben positiv. Abbildung 6 stellt die diagnostischen Befunde graphisch als Tortendiagramm dar. Deutlich ist zu erkennen, dass in beiden Tierställen in etwa die Hälfte der Proben positiv bzw. negativ getestet wurden. Die positiven Proben stammten aus 19 der 29 getesteten Zuchtlinien (65,5%), wobei die Prävalenz innerhalb der Mauslinien durchschnittlich bei etwa 84% lag. Die Quantifizierung der Proben ergab zudem einen durchschnittlichen *viral load* von 5×10^7 Genomeinheiten pro Milliliter (GE / ml).

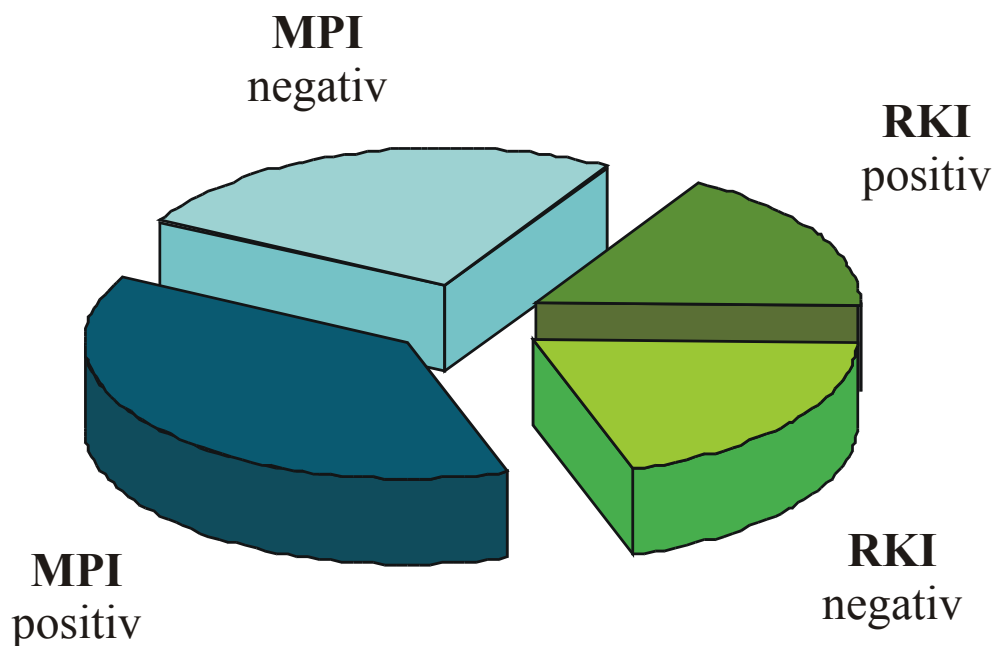


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Verteilung positiv bzw. negativ getesteter Proben im Max Planck- (blau) und Robert Koch-Institut (grün). In dem Diagramm wird die Größe der jeweiligen Gruppe (Kriterium: Institut, pos./neg.) im Verhältnis zu allen getesteten Proben dargestellt. Anzahl der getesteten Proben: MPI n=52, RKI n=30 In beiden Instituten sind in etwa die Hälfte der jeweiligen Proben positiv auf MNV mittels *real-time* PCR getestet worden (dunkel). Auch das Verhältnis der positiv zu den negativ getesteten Proben insgesamt ist vergleichbar.

3.1.2 Morphologische Charakterisierung

Nachdem in den Proben anhand der *real-time* PCR virale Sequenzen nachgewiesen worden sind, sollte überprüft werden, ob aus den Proben ebenfalls intakte Viruspartikel isoliert und dargestellt werden können und inwiefern diese morphologisch dem Referenzvirus MNV-1 entsprechen. Dazu wurden zwei Proben (S36, Probe einer RAG1^{-/-}-Maus und M21, Kot von einer isolierten IFN γ -RI^{-/-}-Maus) mittels Dichtezentrifugation charakterisiert und zusätzlich elektronenmikroskopisch untersucht. Zunächst wurde von den Kotproben eine Suspension hergestellt und durch Zentrifugation die feste Phase abgetrennt. Um die Viruspartikel aufzureinigen und zu pelletieren, wurde mit der wässrigen Phase eine 30 %ige Saccharoselösung überschichtet und anschließend ultrazentrifugiert. Die Viruspartikel wurden resuspendiert und auf eine CsCl-Lösung gegeben. Durch die anschließende Ultrazentrifugation bildet sich innerhalb der CsCl-Lösung ein Dichtegradient, in dem die Viruspartikel sedimentieren bis sie sich in einem Bereich des Gradienten ansammeln, der ihrer eigenen Dichte entspricht. Die Dichte eines Viruspartikels ist eine konstante Größe, anhand derer, neben anderen Merkmalen, eine familiäre Zuordnung bzw. Eingruppierung möglich ist. Um die Dichte der Viren zu bestimmen wurde der Gradient, von oben nach unten, fraktioniert und anschließend die Dichte der Fraktionen mit einem Refraktometer bestimmt. Parallel dazu wurde die virale RNA aus den einzelnen Fraktionen isoliert und anhand der *real-time* PCR quantifiziert. Die Gradienten wurden in jeweils 15 Fraktionen à 400 μ l abgenommen. Die Bestimmung der Dichte der Fraktionen zeigt, dass die CsCl-Lösung einen linearen Gradienten im Bereich von ca. 1,15 bis 1,38 g/cm³ gebildet hat (Abbildung 7). Die Quantifizierung der viralen RNA innerhalb der Fraktionen verdeutlicht für beide Gradienten eine Ansammlung der Viruspartikel in den Fraktionen 11 und 12. Demnach haben die Viruspartikel eine Dichte von $1,33 \pm 0,02$ g/cm³. Diese Ergebnisse entsprechen der Bestimmung der Dichte von MNV-1, da diese mit $1,36 \pm 0,04$ g/cm³ angegeben wurde (Karst, 2003).

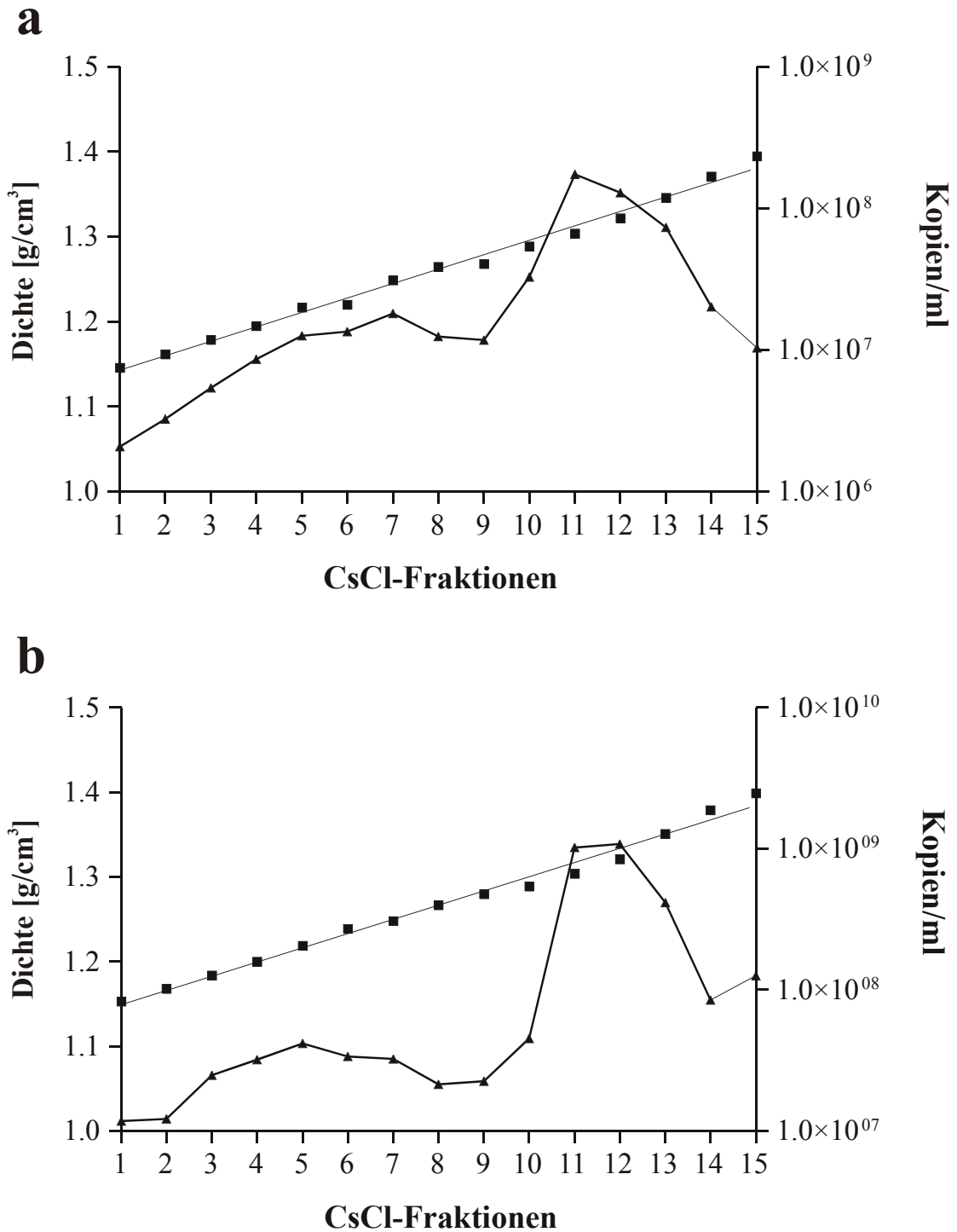


Abbildung 7: CsCl-Gradienten der Proben S36 (a) und M21 (b). Die Viruspartikel wurden aufgereinigt und durch Ultrazentrifugation in einem CsCl-Dichtegradienten sedimentiert. Der Gradient wurde fraktioniert und die Dichte der Einzelfractionen bestimmt. Zudem wurde die virale RNA innerhalb der Fractionen quantifiziert. In den Diagrammen ist die Kopienanzahl der viralen RNA im Verhältniss zu der Dichte der Fractionen dargestellt. In beiden Gradienten haben sich die Viruspartikel den Fractionen 11 und 12 angesammelt, was einer Dichte von $1,33 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$ entspricht.

Neben der Dichte der Viruspartikel ist die Morphologie der Kapside ein familientypisches Charakteristikum. MNV wird in die Familie der *Caliciviridae* eingeordnet. Typisch für alle Vertreter dieser Familie sind ikosaedrische Partikel mit einer Größe von 27 – 34 nm, die eine kelchähnliche Struktur auf der Partikeloberfläche aufweisen. Die Beschaffenheit der Kapside lässt sich nach Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop gut visualisieren. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen der Probe M21 dargestellt. Die Negativkontrastierung erfolgte dabei zum einen mit der wässrigen Phase einer Kotsuspension und zum anderen mit der Fraktion 11 der Dichtezentrifugation (vgl. Abbildung 7). Nach der Adsorption der Viruspartikel an die Grids erfolgte die Kontrastierung mit Uranylacetat. Anschließend wurden die Proben mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht (Abbildung 8).

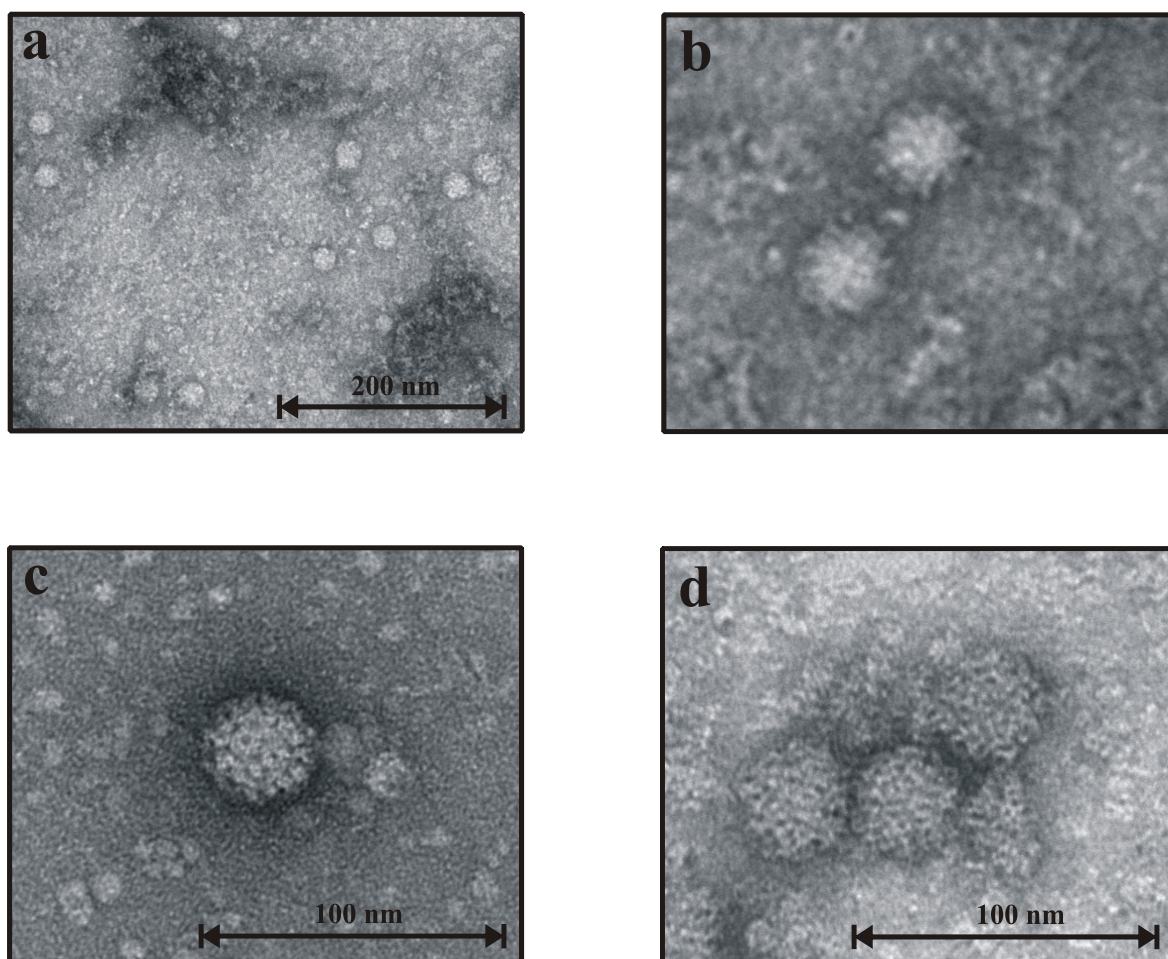


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Probe M21. Anhand von Negativkontrastierung mit Uranylacetat können Viruspartikel aus einer Kotsuspension (a+b) sowie aus einer Fraktion eines CsCl-Gradienten (c+d) dargestellt werden. Die Partikel haben eine durchschnittliche Größe von ca. 30 nm und zeigen die charakteristischen kelchähnlichen Strukturen auf ihrer Oberfläche.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Kotsuspension konnten regelmäßige runde Partikel dargestellt werden (Abbildung 8a), die gleichmäßig auf dem Grid verteilt sind und eine durchschnittliche Größe von 30 nm aufweisen. Bei stärkerer Vergrößerung sind die kelchähnlichen Strukturen auf der Kapsidoberfläche deutlich zu erkennen (Abbildung 8b). Bei der Untersuchung der Fraktion 11 des CsCl-Gradienten konnten ebenfalls charakteristische Viruspartikel nachgewiesen werden (Abbildung 8c+d).

3.1.3 Genetische Diversität muriner Noroviren

Die morphologischen Untersuchungen der Proben zeigen, dass darin enthaltene Viruspartikel dem 2003 entdeckten MNV-1 entsprechen. Um genaue Aussagen hinsichtlich der verwandtschaftlichen Beziehungen der Virusstämme zueinander und zu den bisher charakterisierten murinen Noroviren MNV1-4 treffen zu können sind phylogenetische Analysen notwendig. Für eine ausführliche Analyse sollte daher aus ausgewählten Proben das virale Genom isoliert und sequenziert werden. Totalsequenzen wurden von den Viren aus den Proben M21, S36 und S99 erstellt. Hierzu wurde zunächst die virale RNA präpariert und anschließend mittels Reverser Transkription das ss(+)RNA-Genom in die komplementäre einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Anhand dieser Matrize konnten zwei, sich überlappende Genomfragmente mittels PCR amplifiziert und anschließend in einen prokaryonten Vektor kloniert werden. Für die PCR wurde eine Polymerase mit *proof-reading* Funktion verwendet, um Sequenzunterschiede aufgrund der enzymatischen Prozessierung zu vermeiden. Aufgrund der Klonierung der Genomfragmente für die anschließende Sequenzierung, konnte sichergestellt werden, dass die jeweiligen Sequenzen von einem einzelnen PCR-Produkt stammten. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programm *BioEdit* phylogenetisch analysiert. Dabei wurden die Sequenzen untereinander und mit den Referenzsequenzen verglichen und anhand der *Kimura's 2-Parameter* Methode die evolutionären Distanzen der Sequenzen kalkuliert. Als Referenzen dienten die Sequenzen der Stämme MNV1-4 (Karst, 2003; Hsu, 2006). Um die ermittelten Distanzen graphisch darstellen zu können wurde ein Stammbaum mithilfe der *Neighbor-Joining* Methode erstellt (Abbildung 9). Zudem sind die prozentualen Identitäten der Sequenzen zueinander in Tabelle 11 angegeben. Die Sequenzen der Virusstämme wurden in der Genbank publiziert (siehe Anhang 6.4).

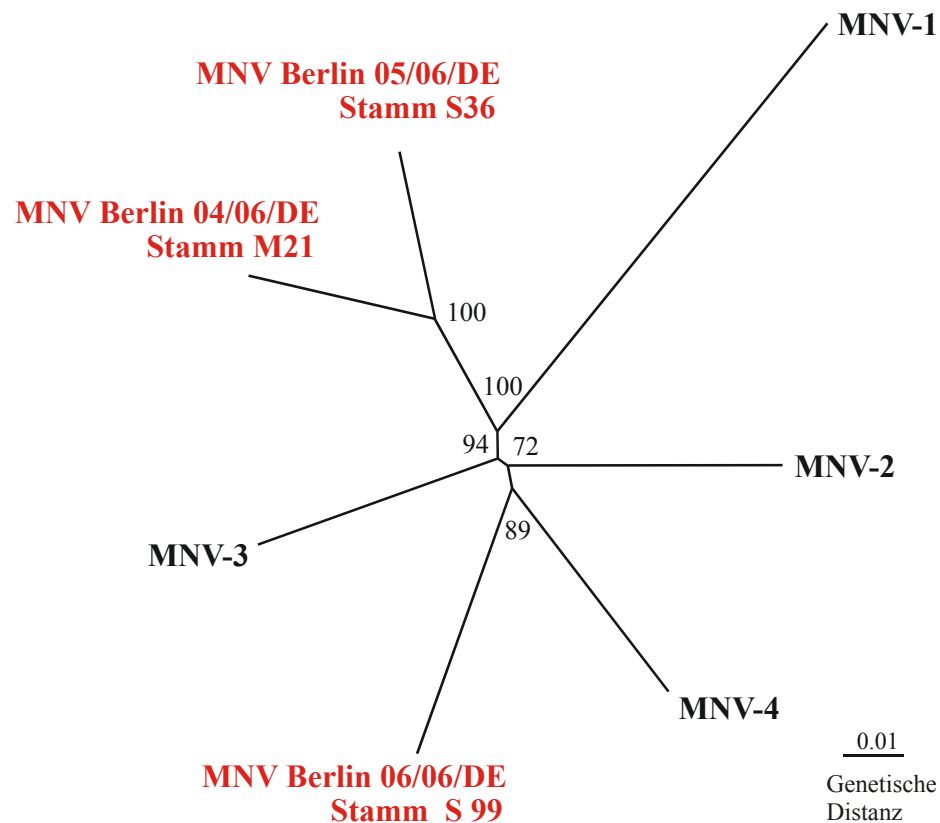


Abbildung 9: Stammbaum der MNV-Genomsequenzen. Dargestellt sind die verwandtschaftlichen Beziehungen der Totalsequenzen der zu charakterisierenden Stämme S36, M21 und S99 (rot) zu den Referenzsequenzen MNV-1 (Genbank-Nr. AY228235), MNV-2 (DQ223041), MNV-3 (DQ223042) und MNV-4 (DQ223043). Die Zahlen an den Verzweigungspunkten geben die Ergebnisse der *Bootstrap* Analyse (1000 Replikate) wieder. Die Länge der Äste ist ein Maß für die evolutionäre Distanz der Viren.

Tabelle 11: Prozentuale Nukleotididentitäten der viralen Genome

	M21 (%)	S36 (%)	S99 (%)
MNV-1	87,1	87,3	87,0
MNV-2	89,6	90,0	90,4
MNV-3	90,7	91,0	91,2
MNV-4	89,8	90,0	91,6
M21	100	94,1	89,9
S36	94,1	100	90,1

Die phylogenetische Analyse der Totalsequenzen zeigt, dass die Viren nicht nur morphologisch, sondern auch molekulargenetisch, den murinen Noroviren zugeordnet werden können. Die genetischen Distanzen der Stämme M21, S36 und S99 zu den Referenzsequenzen MNV1-4 liegen in einem Bereich von 87 bis ca. 92 % Sequenzidentität (Tabelle 11). Die Virusstämme M21 und S36 sind etwas näher miteinander verwandt (94,1 %), was eventuell auf ihr gemeinsame geographische Herkunft (MPI) zurückzuführen ist. S99 dagegen bildet einen eigenständigen Ast im Stammbaum und auch die Sequenzidentitäten verdeutlichen die Autonomie dieses Isolates. Die Bootstrap Analysen ergeben für alle Verzweigungspunkte einen Wert von über 70 %, was als Signifikant erachtet wird und somit alle Verzweigungen als gesichert betrachtet werden können.

Um die Sequenzunterschiede detaillierter untersuchen zu können, wurden SimPlot-Analysen der Totalsequenzen durchgeführt. Diese Analyse ermöglicht eine genaue Darstellung der genetischen Distanzen der Sequenzen im Bezug zu der entsprechenden Position innerhalb des Genoms. Dabei können variable, bzw. konservierte Bereiche lokalisiert und dargestellt werden. Abbildung 10 stellt die Distanzen der Sequenzen von MNV-1, M21 und S99 im Vergleich zu S36 dar. Diese Darstellung verdeutlicht, dass die Diversitäten der Sequenzen nicht über das ganze Genom gleichmäßig verteilt sind. Besonders auffällig ist der Bereich, in dem ORF1 und ORF2 aufeinander treffen, da es dort kaum Sequenzunterschiede zwischen den Genomen gibt. Diese so genannte *junction*-Region ist demnach sehr konserviert. Der konservierte Bereich setzt sich auch im 5'-Bereich von ORF2 fort. Im Gegensatz dazu, zeichnen sich die Sequenzen im weiteren Verlauf von ORF2 durch sehr hohe Diversitäten (bis zu 33%) aus, es handelt sich hier um eine sehr variable Domäne.

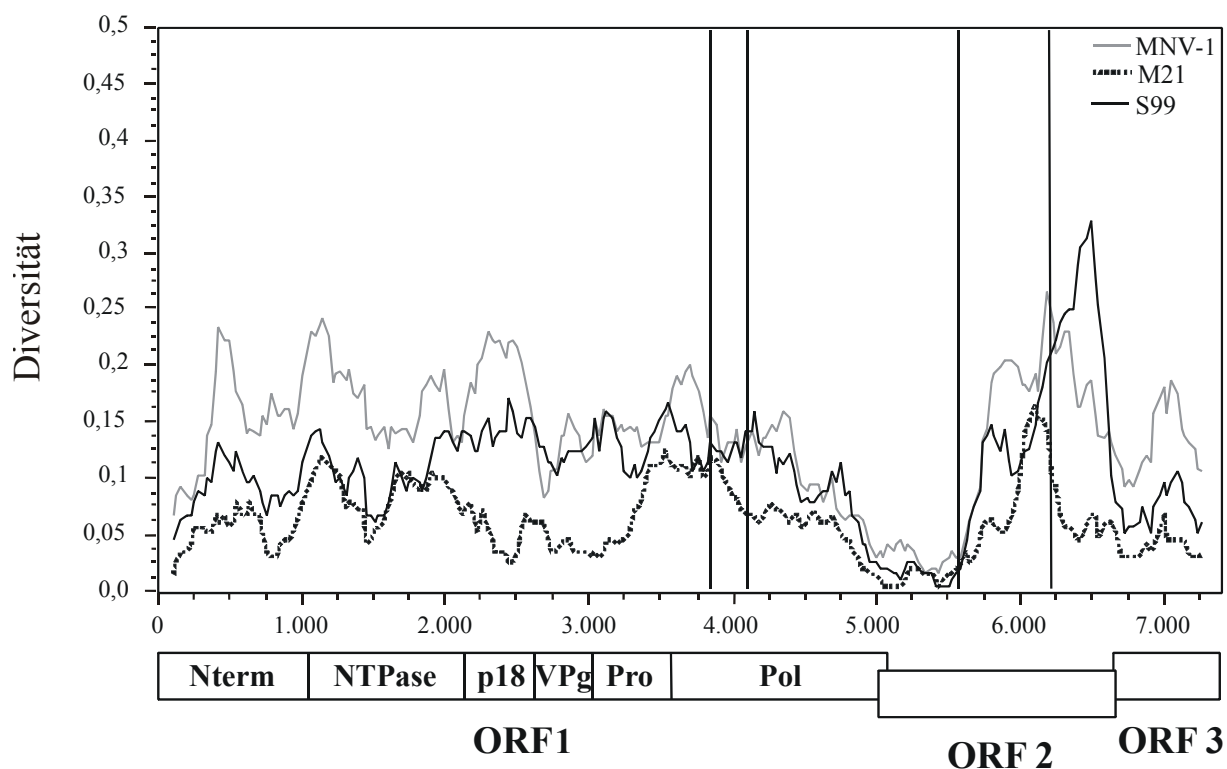


Abbildung 10: SimPlot-Analyse des murinen Norovirus S36. Dargestellt werden die Sequenzunterschiede zu den Stämmen MNV-1, M21 und S99 als relative Diversität im Bezug zu der Position innerhalb des Genoms. Zur Orientierung ist eine schematische Darstellung der Genomorganisation angegeben. Während der Übergangsbereich von ORF1 zu ORF2 stark konserviert ist, zeigen sich im 3'-Bereich des ORF2 sehr hohe Diversitäten. Die vertikalen Linien im Bereich der Polymerase (Pol) und des ORF2 geben die Lokalisationen der Primer für die subgenomische Klassifizierung der MNV-Stämme an.

Anhand von SimPlot-Analysen und der Sequenzalignments der Totalsequenzen wurden zwei subgenomische Bereiche bestimmt, welche einerseits die Diversitäten der Genome charakterisieren und andererseits von relativ konservierten Sequenzen flankiert werden. Aufgrund dieser Bereiche sollten verschiedene Virusstämme, welche zuvor mittels der *real-time* PCR detektiert wurden, klassifiziert werden. Mit Hilfe von Primern, welche die flankierenden Bereiche der subgenomischen Regionen binden, wurden die entsprechenden Genomfragmente durch nested PCRs amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend sequenziert. In Abbildung 10 werden die Lokalisationen der Primer durch vertikale Linien dargestellt. Bei den Genomfragmenten handelt es sich zum einen um ein Teilstück der RNA-Polymerase (ORF1; 312 bp) und zum anderen um ein Ausschnitt der Kapsidsequenz (ORF2; 667 bp). Die Sequenzen wurden, zusammen mit den korrespondierenden Bereichen der Stämme M21, S36 und S99 und der Referenzsequenzen (MNV1-4), phylogenetisch analysiert. Anhand der ermittelten genetischen Distanzen wurden zwei Stammbäume erstellt, welche

die verwandtschaftlichen Beziehungen der Virusstämme, bezogen auf die subgenomischen Bereiche, visualisieren (Abbildung 11). Um die Stammbäume miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst der Begriff „genetisches Cluster“ definiert. Als solches bezeichnet man eine minimale Klassifizierungseinheit für Virusstämme, die sich reproduzierbar auf einem Ast im Stammbaum gruppieren, welcher von anderen Ästen deutlich unterschieden werden kann (Ando, 2000). Sequenzen, bzw. Virusstämme innerhalb eines Clusters zeichnen sich durch geringe genetische Distanzen aus und stehen daher in engen verwandtschaftlichen Verhältnissen zueinander. In Abbildung 11 werden die genetischen Cluster durch gestrichelte Linien hervorgehoben. In beiden Stammbäumen gruppieren sich die Viren in jeweils vier Cluster, welche sich von den Referenzsequenzen MNV1-4 separieren. Die Virusstämme innerhalb der Cluster im Stammbaum für ORF1 haben genetische Distanzen von 0 – 0,0766 und im ORF2-Stammbaum von 0 – 0,0494. Die Bootstrap-Analysen verdeutlichen, dass diese Clustereinteilungen reproduzierbar sind und daher als signifikant erachtet werden können.

Für die meisten Virusstämme wird die Clustereinteilung innerhalb des ORF1 im ORF2 reflektiert. Im Gegensatz dazu gruppieren sich die Viren S25, S27 und S28 in verschiedene Cluster ein. Während sie im ORF1 anscheinend eng mit S36 verwandt sind, clustern sie im ORF2 mit M21. Auch die Referenzsequenz MNV-4 ordnet sich unterschiedlich in den Stammbäumen ein. Im ORF1-Stammbaum bildet sie einen eigenständigen Ast, im ORF2 dagegen clustert sie mit S99.

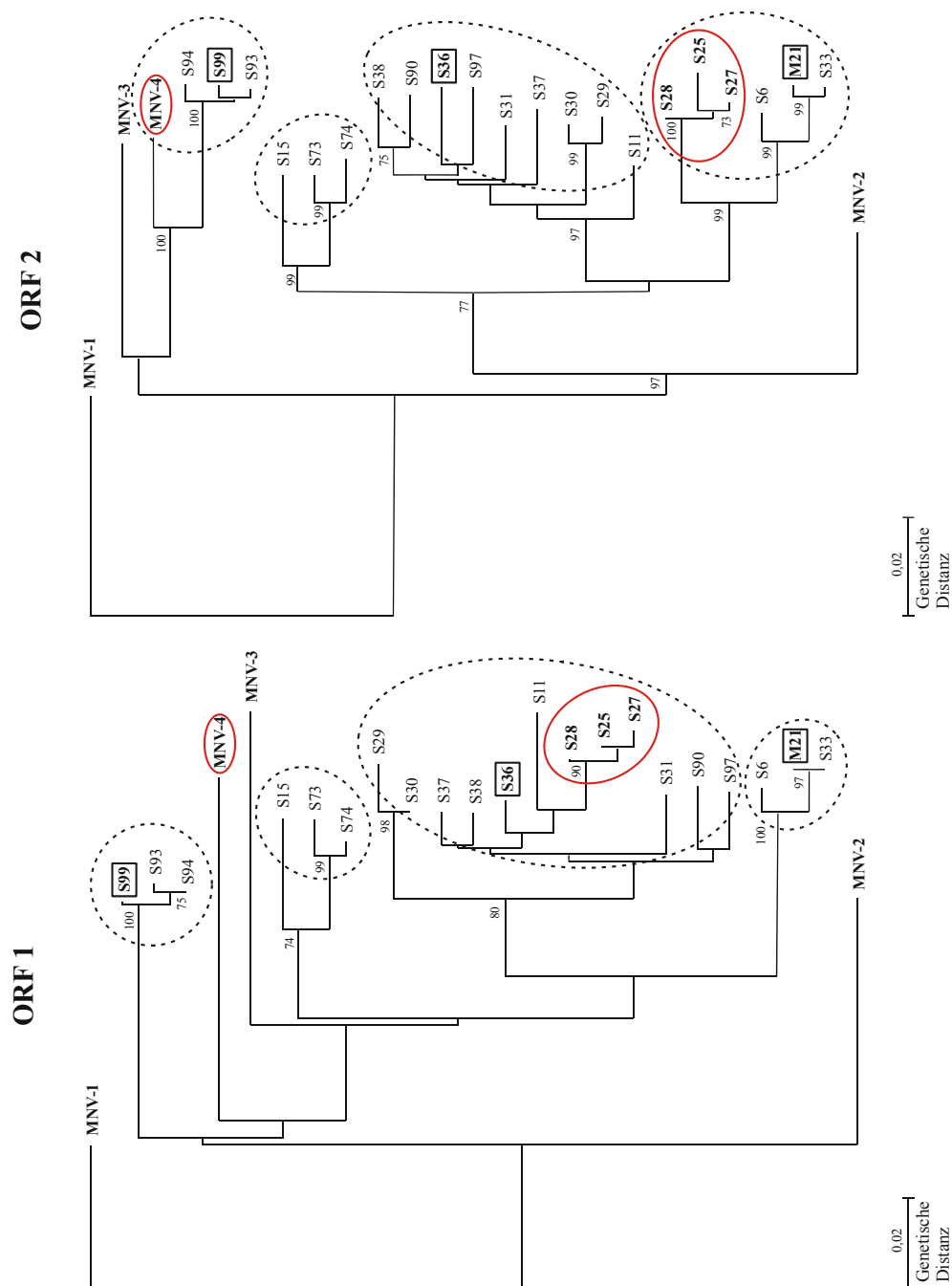


Abbildung 11: Phylogenetische Analyse der Teilsequenzen aus ORF1 (RNA-Polymerase, 312 bp) und ORF2 (VP1, 667 bp). Die korrespondierenden Sequenzen der Referenzstämme MNV1-4 und der Stämme M21, S36 und S99 sind angegeben. Die Virusstämme bilden in beiden Stammbäumen jew. vier Cluster, die sich von den Referenzstämmen deutlich separieren. Die Clustereinteilung wird durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Mit wenigen Ausnahmen (rot) ordnen sich die Viren in beiden Stammbäumen in identische Cluster ein.

3.2 Nachweis homologer Rekombination bei murinen

Noroviren

3.2.1 *In-vivo*-Rekombinationsereignisse

Im Rahmen einer Koinfektion des Wirts mit zwei Subtypen einer Virusfamilie kann es zu einer Neusortierung der genetischen Informationen der Virusstämme kommen. Bei der homologen Rekombination, ein Phänomen, welches für humane Noroviren bereits beschrieben wurde, findet dabei ein Austausch von Genomregionen statt. Dieser Austausch kommt dadurch zustande, dass die RNA-abhängige RNA-Polymerase während der Transkription im Bereich von homologen Sequenzabschnitten von einem Elternstrang zum anderen wechselt, um dort mit der Synthese des Virusgenoms fortzufahren. Die folgende Virusgeneration enthält somit Genomabschnitte von beiden Elternsträngen. Demnach kann die unterschiedliche phylogenetische Zuordnung von Genomfragmenten eines Virusstammes, wie sie in Abbildung 11 dargestellt wurde, ein Hinweis auf intertypische Rekombination sein. Im Folgenden sollte demzufolge untersucht werden, ob es sich bei den entsprechenden Viren (S28 bzw. MNV-4) um Rekombinanten handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden SimPlot-Analysen dieser Viren durchgeführt. Dazu wurde ein größeres Genomfragment, welches idealerweise die bereits zuvor getestete Teilfragmente enthält, amplifiziert und nach Insertion in einen prokaryonten Vektor sequenziert. Das Amplifikat hatte eine Länge von 2410 bp und beinhaltet das 3'-Ende von ORF1 und den 5'-Bereich vom ORF2. Mittels der SimPlot-Software wurden diese Sequenzen anschließend mit den putativen Elternsträngen verglichen und analysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Gruppierung des Stammes S28 in Abbildung 11 wurde die Sequenz bei der SimPlot-Analyse mit M21 und S36 verglichen (Abbildung 12a). Das 3'-Ende des untersuchten Genomfragmentes von S28, welches der RNA-Polymerase-Region im ORF1 entspricht, hat hohe Similaritäten zu der Referenzsequenz S36 (ca. 98%). Dagegen zeigt die Sequenz in diesem Bereich deutlich weniger Homologien zu M21. In der konservierten *junction*-Region nähern sich dann alle drei Sequenzen phylogenetisch aneinander an, weitergehend werden die Similaritäten dann in 5'-Richtung wieder geringer. Im Gegensatz zu den Sequenzen im ORF1, weist das Virus S28 im ORF2 jetzt höhere Similaritäten zu M21 als zu S36 auf. Die verwandtschaftlichen Beziehungen der Stämme zueinander haben sich im ORF2 umgekehrt.

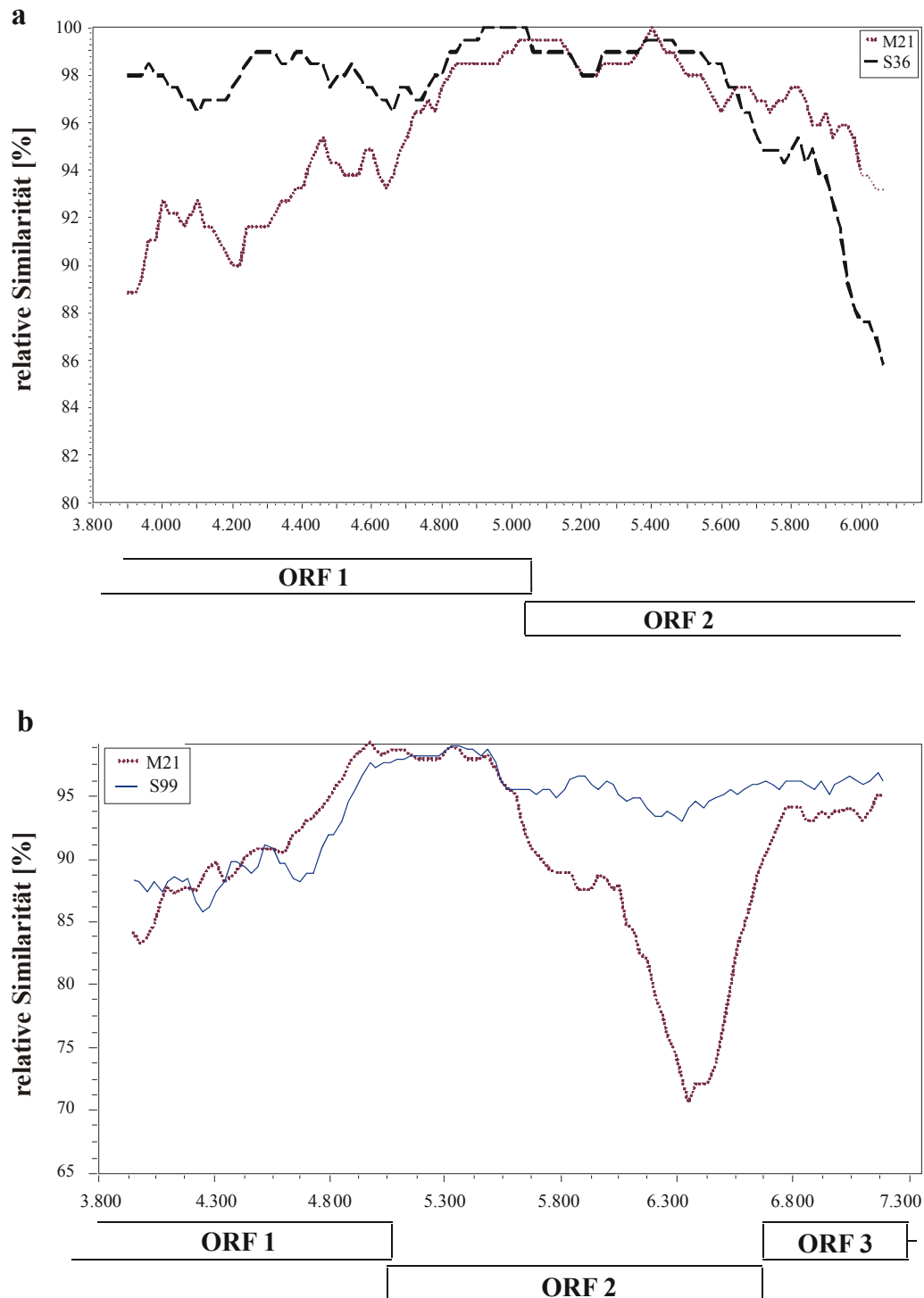


Abbildung 12: SimPlot-Analysen der Rekombinanten S28 und MNV-4. Dargestellt werden die relativen Similaritäten der Nukleotidsequenzen der Stämme S28 (a) und MNV-4 (b) zu den putativen Elternsträngen. Während S28 im Bereich von ORF1 höhere Similaritäten zu S36 aufweist, ist die Homologie im ORF2 zu M21 größer. MNV-4 zeigt im ORF1 keine nähere verwandtschaftliche Beziehung zu den Referenzen M21 und S99. Demgegenüber sind die relativen Similaritäten im ORF2 und ORF3 zu S99 deutlich höher, was auf eine gemeinsame evolutionäre Herkunft in diesem Genombereich hinweist.

Abbildung 12b zeigt die SimPlot-Analyse der putativen Rekombinante MNV-4. Es werden die relativen Similaritäten von MNV-4 zu den Stämmen M21 und S99 dargestellt. Da von allen Viren die Totalsequenzen vorlagen, konnten hier die Similaritäten der gesamten Genome miteinander verglichen werden. Dargestellt ist das 3'-Ende von ORF1, sowie ORF2 und ORF3. Wie schon im Stammbaum des ORF1-Sequenzabschnittes dargestellt (Abbildung 11), zeigt MNV-4 innerhalb dieses Genomabschnittes nur geringe verwandtschaftliche Beziehungen zu den Stämmen M21 und S99. Die Similaritäten sind gering und entsprechen in etwa den Distanzen der Totalsequenzen (vgl. Tabelle 11). Betrachtet man hingegen den Genombereich 3' von der konservierten *junction*-Region, ist ein enges verwandtschaftliches Verhältniss von MNV-4 zu S99 zu erkennen (relative Similaritäten >93%). Die Ergebnisse der SimPlot-Analysen bekräftigen die Hypothese, dass es sich bei den Virusstämmen S28 und MNV-4 um intertypische Rekombinanten handelt.

3.2.2 *In-vitro*-Rekombination

Zu einer intertypischen Rekombination zweier Virusgenome kann es nur dann kommen, wenn beide Genome sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Dieses ermöglicht der RNA-abhängigen RNA-Polymerase während der Transkription von einem Genom zum anderen zu wechseln und so die genetische Information zweier Elterstränge zu einem neuen, hybriden Virusstamm zu vermischen. Grundvoraussetzung für die Rekombination ist demnach die zeitgleiche Infektion einer Wirtszelle mit genetisch differenten Viren. Da das murine Norovirus *in vitro* kultiviert werden kann, sollte mit diesem Experiment die eben beschriebene Situation simuliert werden, um intertypische Rekombinationsereignisse untersuchen zu können. Zunächst wurden die genetisch differenten MNV-Stämme M21 und S99 auf RAW 264.7 Zellen angezüchtet. Dazu wurden Kotsuspensionen der entsprechenden Proben hergestellt und die wässrige Phase nach Zentrifugation sterilfiltriert. Mit Verdünnungen dieser Suspensionen wurden RAW 264.7-Zellen (ca. 50 – 80% konfluent) infiziert. Nach Auftreten eines cpe bzw. der vollständigen Lyse der Zellen (nach ca. 48 h) wurden die Viren geerntet und die Titer der Virussuspensionen bestimmt.

Die anschließende Kokultivierung der Isolate wurde in 6-*well* Platten durchgeführt, dabei diente je ein *well* der Kultivierung der Elternviren (P-Generation) und in 3 *wells* wurden Kokultivierungen der beiden Stämme durchgeführt (ABC, F1-Generation). Für die Kokultivierungen wurden definierte Verdünnungen der Virusstocks (M21: 100xID₅₀; S99: 10xID₅₀) gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach 1 stündiger Infektion wurden die Virussuspensionen entnommen, frisches Anzuchtmedium auf die Zellen gegeben und die Platten für 24 h im Brutschrank inkubiert. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen lysiert und die darin entstandene virale RNA präpariert.

Mittels hyperspezifischer PCRs wurden die viralen Genome selektiv amplifiziert und charakterisiert. Zunächst wurden die Genome in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dabei wurde ein Primer verwendet, welcher am poly-A-Schwanz der (+)RNA bindet und daher die unspezifische Synthese der cDNAs, ohne eine Selektion bestimmter Typen, ermöglicht. Mit der gewonnenen cDNA wurden anschließend parallel vier PCRs durchgeführt. Dabei amplifiziert PCR 1 Virusgenome, die ausschließlich M21 entsprechen, analog dazu ist PCR 2 spezifisch für den Elternstrang S99. PCR 3 und PCR 4 dagegen amplifizieren spezifisch die intertypischen Rekombinanten. So ergibt PCR 3 nur dann ein Produkt, wenn ORF1 dem Elternstrang M21 entspricht und mit S99 (ORF2) rekombiniert hat. PCR 4 erkennt das umgekehrte Rekombinationsereigniss, ORF1 von S99 hat mit dem ORF2 von M21 rekombiniert. Die Auswertung der hyperspezifischen PCRs erfolgt mittels Gelelektrophorese, wobei die Reaktionansätze parallel aufgetragen werden und so miteinander verglichen werden können (Abbildung 13).

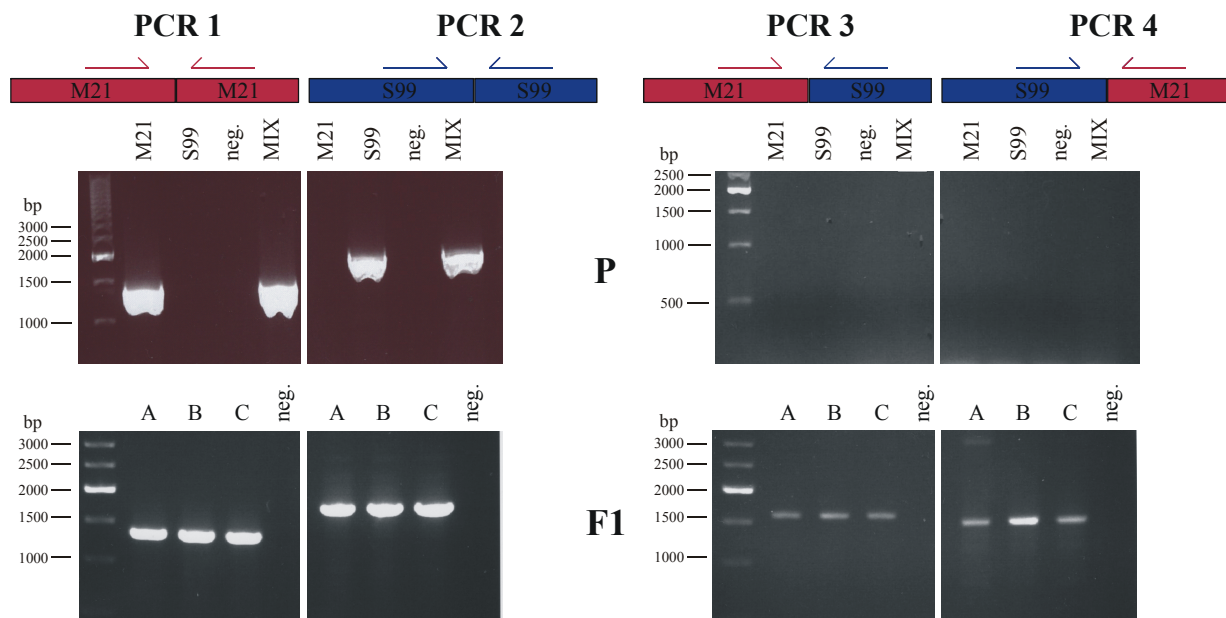


Abbildung 13: Gelelektrophoretische Analyse der hyperspezifischen PCRs zur Charakterisierung von Rekombinationsereignissen *in vitro*. Die Spezifität der PCRs 1 – 4 ist schematisch dargestellt, darunter befinden sich die Ergebnisse der PCRs nach separater Kultivierung der Elternstränge (P-Generation, M21 und S99), bzw. der Kokultivierungen (F1-Generation, Ansätze A, B, C). PCR 1 und PCR 2 amplifizieren spezifisch die Isolate M21 und S99 in der P- und der F1-Generation. Die rekombinationsspezifischen PCRs 3 und 4 bilden in den Ansätzen der F1-Generation Produkte, nicht aber in der P-Generation.

In der P-Generation wurden die Elternviren separat kultiviert und können dementsprechend mit den Reaktionsansätzen PCR 1 (M21, 1356 bp) und PCR 2 (S99, 1786 bp) amplifiziert werden. In PCR 3

und PCR 4 werden keine Produkte gebildet, wodurch die Spezifität der PCRs bestätigt wird. Auch die Kontrollamplifikation, bei der die RNAs der Elternviren gemischt wurden liefern keine Produkte (MIX), was eine artifizielle Bildung von rekombinanten Amplifikaten durch die PCR ausschliesst. Dagegen können nach 24 stündiger Kokultivierung der Viren (F1-Generation) zusätzlich zu den Elternviren auch Rekombinanten nachgewiesen werden. Es haben beide untersuchten Rekombinationsereignisse stattgefunden. Sowohl PCR 3 (1618 bp), als auch PCR 4 (1524 bp) amplifizieren spezifisch in allen drei Ansätzen der Kokultivierung (A, B, C) rekombinante Virusgenome.

Um zu bestätigen, dass es sich bei den PCR-Produkten der F1-Generation tatsächlich um Amplifikate von Rekombinanten handelt, wurden SimPlot-Analysen der Sequenzen durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Produkte der PCR-Reaktionen 3 und 4 aus dem Elektrophoresegel ausgeschnitten, die DNA extrahiert und anschließend in einen prokaryonten Vektor inseriert (TA-Klonierung). Nach Transformation in kompetenten Bakterien (TOP10; *E.coli*) wurde die Plasmid-DNA vermehrt und nach Extraktion sequenziert. In Abbildung 14 sind Beispiele der SimPlot-Analysen der *In-vitro*-Rekombinanten dargestellt. Abbildung 14a zeigt die Analyse eines PCR-Produktes aus der PCR 3. Die SimPlot-Analyse bestätigt die Rekombination des ORF1 von M21 mit dem ORF2 von S99. Analog dazu bestätigt die Analyse der Sequenz des Produktes der PCR 4 das umgekehrte Rekombinationsereigniss (Abbildung 14b). Anders als erwartet hat die Rekombination aber nicht in der *junction*-Region, also im Übergang von ORF1 zu ORF2 stattgefunden. Betrachtet man die Sequenzalignments und SimPlot-Analysen genauer, lässt sich ein homologer Bereich innerhalb des ORF2 charakterisieren. In diesem Bereich hat die Rekombination stattgefunden.

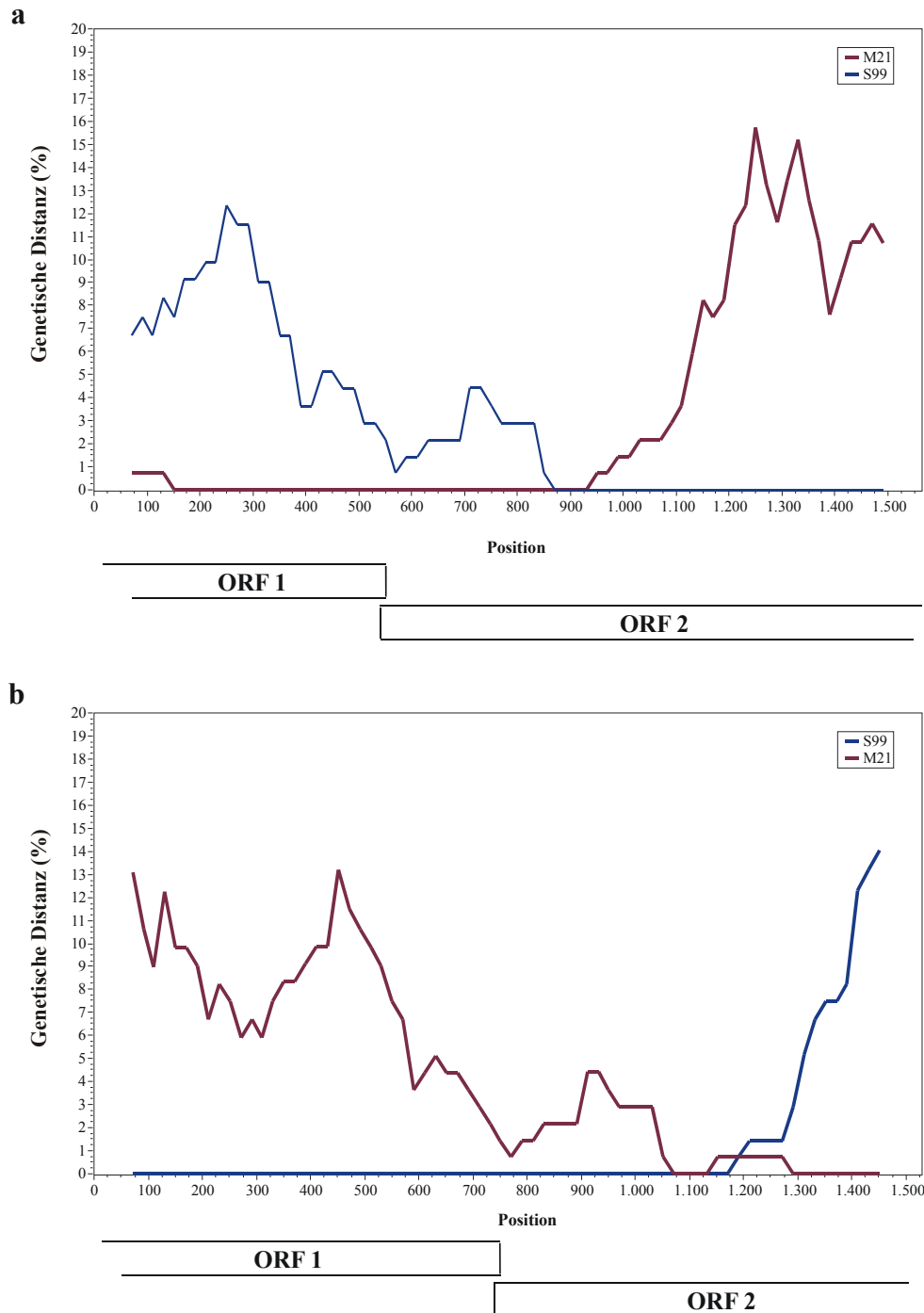


Abbildung 14: SimPlot-Analysen der *In-vitro*-Rekombinanten. Nach Kokultivierung der Isolate M21 und S99 findet in den infizierten Zellen Rekombination statt. Die Rekombinanten wurden selektiv amplifiziert und sequenziert. (a) SimPlot-Analyse einer Rekombinante, deren Genom im 5' Bereich MNV-M21 entspricht, dagegen im ORF2 dem Stamm S99 zugeordnet werden kann. (b) Die genetischen Distanzen dieser Analyse verdeutlichen das umgekehrte Rekombinationsereignis. ORF1 des hybriden Genoms entspricht S99, ORF2 dagegen M21. Innerhalb von ORF2 befindet sich ein homologer Sequenzbereich, in dem die *In-vitro*-Rekombination stattgefunden hat.

3.3 *In-vitro*-Charakterisierung genetisch differenter MNVs

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Virusstämme zwar morphologisch nicht unterscheidbar sind, demgegenüber aber gewisse genetische Diversitäten aufweisen. In den folgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, inwiefern diese Stämme auch funktional unterschieden werden können. Zu diesem Zwecke sollte die Pathogenese der Isolate M21, S99 und des Referenzvirus MNV-1, welches freundlicherweise von Herbert W. Virgin und Christiane Wobus (Washington University, USA) zur Verfügung gestellt wurde, *in vitro* miteinander verglichen werden.

3.3.1 MNV-Stämme können anhand ihrer Kinetiken unterschieden werden

Als ein mögliches Unterscheidungskriterium der Virusstämme wurde ihr Replikationsverhalten *in vitro* untersucht. Dazu wurden die Wachstumskinetiken einzelner Isolate bestimmt. Zunächst wurden Virusstocks der Viren MNV-1, S99 und M21 durch Anzucht auf RAW 264.7-Zellen hergestellt. Anschließend wurde mittels Titration die Konzentration der Stocks bestimmt. Um eine vergleichbare Ausgangskonzentration der Virusisolate einsetzen zu können, wurden die Virusstocks, der Titration entsprechend, auf die letzte positive Verdünnungsstufe eingestellt ($\text{MOI} = 1$). Mit diesen Virusverdünnungen wurden dann RAW 264.7-Zellen infiziert und anschließend im Brutschrank inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 6, 12, 18, 24, 30 und 36h) wurden die Zellen lysiert und die Konzentrationen der Virusgenome mittels *real-time* PCR quantifiziert. Abbildung 15 stellt die Ergebnisse dieses Experimentes graphisch dar. Angegeben ist die Konzentration der Genomeinheiten (Kopien / ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. In den ersten 12 h zeigen die Wachstumskinetiken der drei Isolate identische Verläufe. Während zu den Zeitpunkten 1 und 6 h keine Genomeinheiten nachweisbar sind, können nach 12 h Inkubationszeit in den Ansätzen vergleichbare Virusmengen detektiert werden. Im weiteren Verlauf unterscheiden sich die Wachstumskurven in den Virusmengen, die von den verschiedenen Isolaten repliziert werden. Während die Konzentrationen des Referenzvirus MNV-1 und des Isolat S99 nach 36 h $\geq 10^9$ Kopien / ml erreichen, ist die Replikationseffizienz des Isolates M21 mit einer Endkonzentration von ca. 10^8 Kopien / ml um den Faktor 10 geringer.

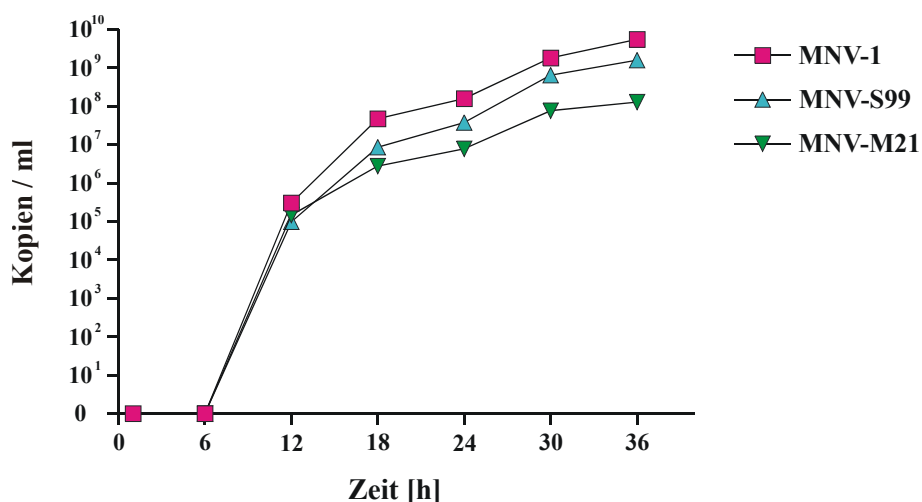


Abbildung 15: Wachstumskinetiken der Virusstämme MNV-1, S99 und M21. RAW 264.7-Zellen wurden mit äquivalenten Viruskonzentrationen der Isolate infiziert (MOI = 1). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Viruskonzentrationen der Infektionsansätze mittels *real-time* PCR quantifiziert. Der zeitliche Verlauf der Virusreplikation ist für die untersuchten Isolate vergleichbar. Das Erreichen unterschiedlicher Endkonzentrationen nach 36h deutet aber auf unterschiedliche Replikationseffizienzen der Virusisolate hin.

3.3.2 Interferon-beta-Sensitivität

In vivo und *in vitro* Untersuchungen des Referenzvirus MNV-1 haben gezeigt, dass die Replikation des Virus durch Faktoren des angeborenen Immunsystems beeinflusst wird (Wobus, 2004). Als Bestandteil des primären Immunsystems reagieren Zellen, die von einem Virus infiziert wurden, mit der Produktion und Ausschüttung der Typ-I-Interferone IFN α und IFN β . Durch entsprechende Rezeptoren (IFN α/β -R) auf der Zelloberfläche wird daraufhin ein antiviraler Status der infizierten (autokrin) und der benachbarten (exokrin) Zellen induziert. Im Rahmen dieses Status wird unter anderem die Translationsfähigkeit der Zellen reduziert, wodurch die Produktion von Virusproteinen gestoppt oder ganz verhindert wird. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, inwiefern die unterschiedlichen Replikationseffizienzen der Virusisolate *in vitro* eventuell auf unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Typ-I-Interferon zurückzuführen sind. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden RAW 264.7-Zellen zunächst mit den Virusisolaten M21, S99 bzw. MNV-1 infiziert. Die anschließende Inkubation erfolgte dann in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von IFN β (1, 10 bzw. 25 U/ml Anzuchtmedium). Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1, 6, 12, 18, 24, 30 und 36h) wurden die infizierten Zellen lysiert und die Viruskonzentrationen der Ansätze mittels *real-time* PCR quantifiziert. In Abbildung 16 werden die unterschiedlichen Sensitivitäten der Isolate gegenüber IFN β graphisch dargestellt. Zum Vergleich sind die Wachstumskinetiken der Virusisolate, in Abwesenheit von IFN β , angegeben.

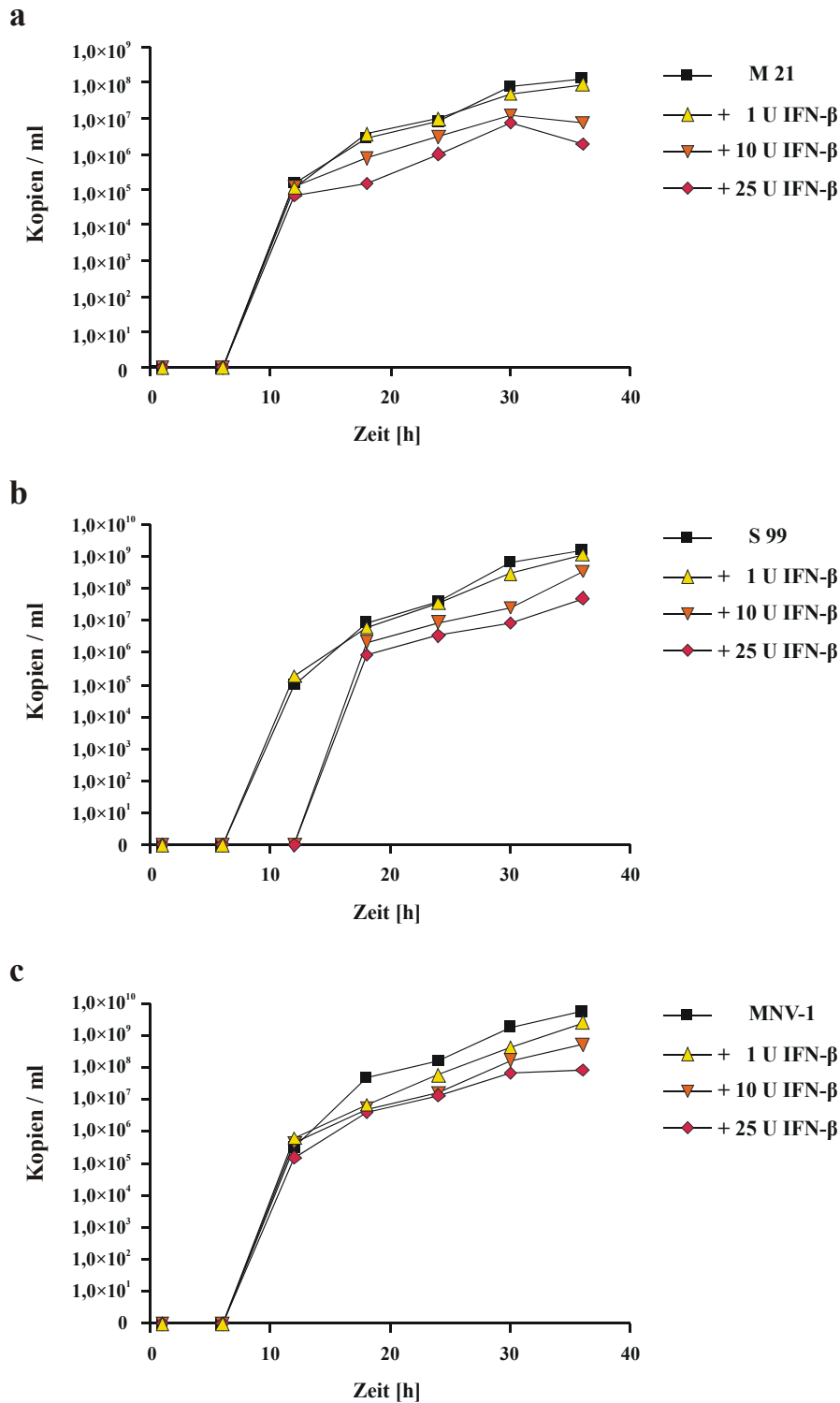


Abbildung 16: Wachstumskinetiken der Stämme M21 (a), S99 (b) und des Referenzvirus MNV-1 (c) in Abhängigkeit verschiedener IFN β -Konzentrationen. Während die Zugabe von 1U IFN β /ml die Replikation der Viren kaum beeinflusst, werden die Wachstumskinetiken durch die Zugabe höherer Konzentrationen IFN β (10 bzw. 25 U/ml) flacher. Es werden deutlich geringere Endkonzentrationen erreicht, wodurch die IFN β -Sensitivität der Viren bestätigt wird. Bei dem Isolat S99 wird die Replikation durch IFN β zudem zeitlich verzögert.

Durch Zugabe von 1U IFN β / ml in das Anzuchtmedium haben sich die Wachstumskinetiken der Viren, im Vergleich zu denen in den Kontrollansätzen, nicht signifikant verändert. Dagegen bewirkt die Zugabe höherer Konzentrationen IFN β (10 und 25 U / ml) eine deutliche Abflachung der Wachstumskurven. Die Beeinträchtigung der Virusreplikation durch IFN β führt zu einer Reduktion der Endpunkttiter nach 36h, welche bei allen drei Isolaten um den Faktor 100 geringer sind, als in den Kontrollansätzen. Das Isolat S99 zeigt nicht nur eine deutliche Reduktion der finalen Virustiter, zudem ist die Replikation auch zeitlich verzögert (Abb. 16b). In Anwesenheit der höheren Konzentrationen IFN β sind Virusgenome erst 18h nach der Infektion quantifizierbar. In den Kontrollen konnte schon nach 12h Virusreplikation nachgewiesen werden.

3.4 Nachweis persistierender Virusinfektionen

Die Kotproben, welche eingangs auf das Vorhandensein von MNV getestet wurden, stammten aus Käfigen, in denen bis zu 10 Mäuse untergebracht waren. Die Virusprävalenzen können demzufolge nicht einzelnen Tieren zugeordnet werden. Um die Infektion der Tiere genauer untersuchen zu können wurden daher, aus einem Käfig mit positivem Befund, Mäuse herausgenommen und einzeln gesetzt. Zur weiteren Untersuchung wurden vier $\text{IFN}\gamma\text{-RI}^{-/-}$ -Mäuse isoliert. Einen Tag nach der Isolation der Mäuse wurden Kotproben aus den Käfigen entnommen und anhand von *real-time* PCR das Vorhandensein von MNV-RNA überprüft. Nachdem die Prävalenz bei allen vier Mäusen bestätigt wurde, erfolgte eine genetische Charakterisierung der ausgeschiedenen Viren. Dazu wurden zwei subgenomische Bereiche mittels nested-PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (vgl. 3.1.3). Die Viren konnten dem Cluster um das Virus M21 zugeordnet werden (vgl. Abb.11). Über einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 110 Tagen wurden regelmäßig Kotproben der Tiere gesammelt und die Virusausscheidung quantifiziert (Abbildung 17). Während dieser Zeit wurde das Virus kontinuierlich von den Mäusen ausgeschieden, was als eine persistierende Infektion der Tiere angesehen werden kann. Die *viral loads* der Proben waren über den gesamten Beobachtungszeitraum vergleichbar (Durchschnittlich ca. 10^7 Kopien / ml).

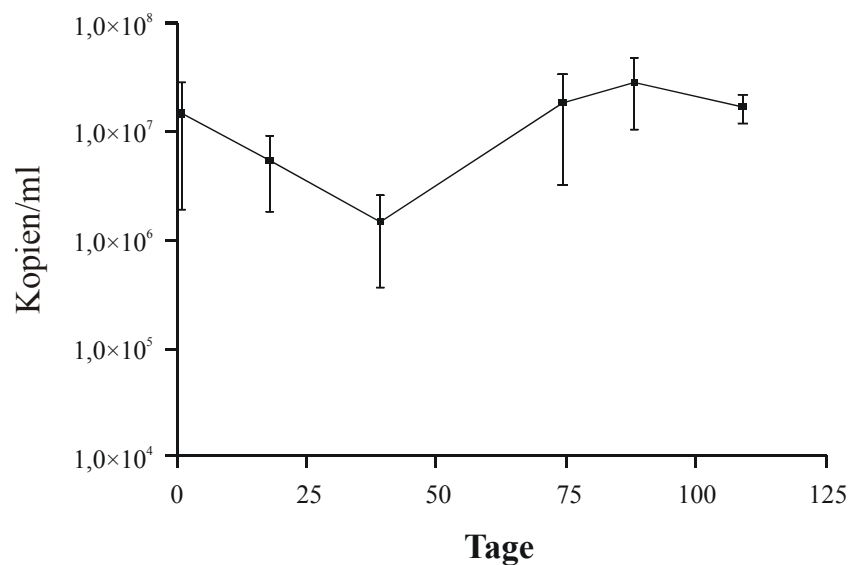


Abbildung 17: MNV-M21 persistiert in natürlich infizierten $\text{IFN}\gamma\text{-RI}^{-/-}$ -Mäusen. Am Tag 0 wurden die Mäuse (n=4) voneinander getrennt und in separaten Käfigen untergebracht. In regelmäßigen Abständen wurden Kotproben aus den Käfigen entnommen und mittels *real-time* PCR der *viral load* der Proben gemessen. Virussausscheidung konnte während des gesamten Beobachtungszeitraums (110 Tage) nachgewiesen werden.

In der vorhergehenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass MNV-M21 in natürlich infizierten IFN γ -RI^{-/-}-Mäusen über einen längeren Zeitraum persistiert. Aufgrund des Genotyps der Mäuse kann aber keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Persistenz der Pathogenese des Virus entspricht, oder die Immundefizienz des Wirtes ursächlich für die andauernde Infektion ist. Um diesen Aspekt der Persistenz zu untersuchen, wurden Wildtyp-Mäuse (Bl6) mit MNV-M21 infiziert. Nachdem die Mäuse (n = 4) MNV-frei diagnostiziert wurden, erfolgte die Infektion der Mäuse durch orale Applikation von jew. 200 μ l eines Zellkulturüberstandes mit einer 100 fachen MOI des Isolates M21. Der Infektionsverlauf wurde durch regelmäßige Quantifizierung der Virausscheidung charakterisiert (Abbildung 18). Bereits 2 bzw. 3 (n=1) Tage nach oraler Gabe konnte die Ausscheidung des Virus im Kot der Mäuse nachgewiesen werden. Wie auch schon bei den IFN γ -RI^{-/-}-Mäusen wurde das Virus während des gesamten Beobachtungszeitraums (73 Tage) von den Wildtyp-Mäusen ausgeschieden. Die Inokulation der Mäuse mit dem Isolat M21 induziert eine persistierende Infektion.

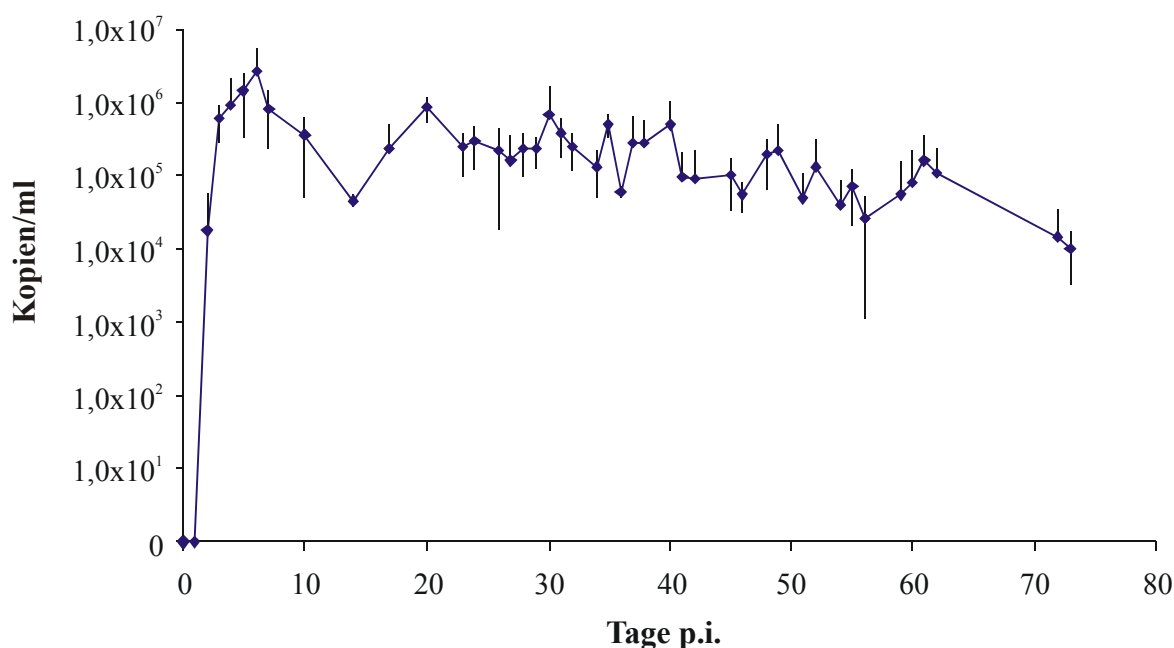


Abbildung 18: M21-Virus persistiert in Wildtyp-Mäusen (Bl6) nach oral induzierter Infektion. Am Tag 0 wurden die Mäuse (n = 4) *per os* mit dem Isolat M21 (MOI = 100) infiziert. Durch regelmäßige Untersuchungen von Kotproben mittels *real-time* PCR wurde der Infektionsverlauf charakterisiert. Die Ausscheidung des Virus konnte 2-3 Tage *post infectionem* (p.i.) erstmals detektiert werden und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant.

Mögliche Ursache einer Viruspersistenz kann die mangelnde Ausbildung spezifischer Antikörper sein, weswegen das Immunsystem den Erreger nicht eliminieren kann. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, inwiefern es zu einer protektiven, humoralen Immunantwort im Rahmen der persistenten Infektion von Wildtyp-Mäusen mit M21 gekommen ist. Dazu wurde den Mäusen, vor der Inokulation und 21 Tage nach der Infektion, Serum entnommen und die Bildung spezifischer Antikörper mittels Neutralisationstest nachgewiesen. Die Seren wurden zunächst 1:30 in PBSO verdünnt und anschließend sterilfiltriert. Es wurden Verdünnungsreihen der Seren mit Anzuchtmedium hergestellt und nach Zugabe einer definierten Menge MNV für 3h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf RAW264.7-Zellen gegeben und für ca. 63h im Brutschrank inkubiert. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde jene Serumverdünnung bestimmt, bis zu der kein cpe oder die komplette Lyse der Zellen nachweisbar war. Abbildung 19 stellt die Ergebnisse des Neutralisationstests graphisch dar. Während in keinem der Seren, welche vor der Infektion entnommen wurden (prä), Antikörper nachgewiesen werden konnten, haben alle vier Wildtyp-Mäuse (BI-IV) 21 Tage nach Infektion mit MNV-M21 (post) neutralisierende Antikörper gebildet.

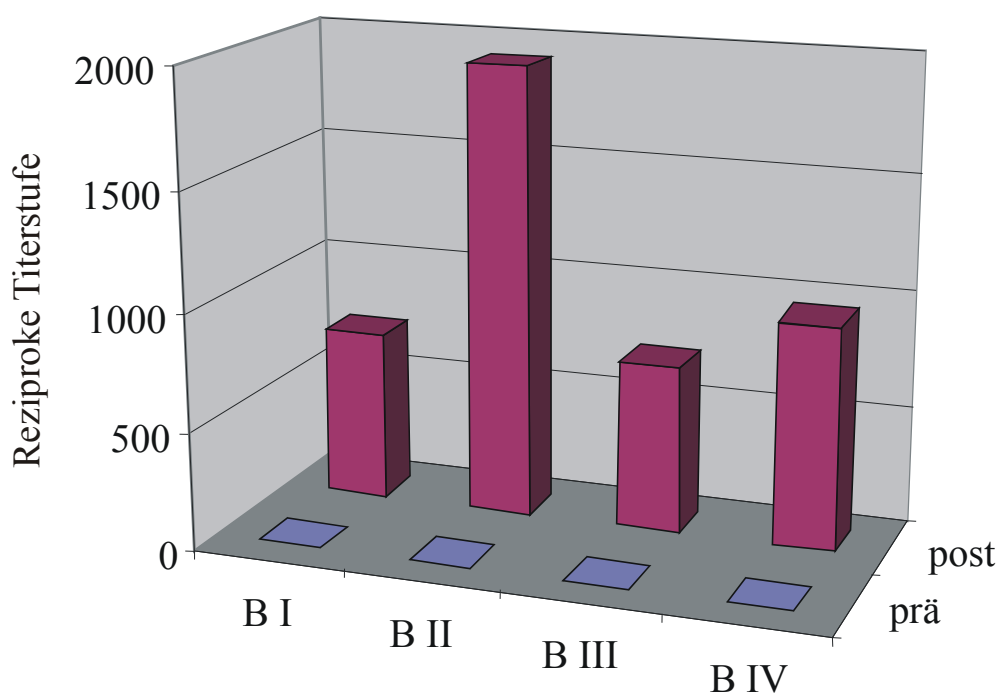


Abbildung 19: Neutralisationstest. 21d p.i. können in den Seren der infizierten Wildtyp-Mäuse (BI – BIV) neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (post). In den Kontrollseren, die vor der oralen Applikation mit MNV-M21 entnommen wurden (prä) sind keine neutralisierenden Antikörper vorhanden. Dargestellt wird der Mittelwert (n=3) der Endpunkttitration indirekt, als reziproke Titerstufe.

3.5 Antigendrift

Viren haben unterschiedliche Strategien entwickelt dem angeborenen oder dem adaptiven Immunsystem zu entgehen. Die Mechanismen, welche es einem Virus ermöglichen persistierende Infektionen auszulösen, sind dabei sehr vielfältig. Durch fortwährende Änderungen der antigenen Eigenschaften (Antigendrift) können Viren zum Beispiel die humorale Immunabwehr unterlaufen, da gebildete protektive Antikörper nicht mehr in der Lage sind den Erreger zu erkennen. Da MNV-M21 ungeachtet der Bildung neutralisierender Antikörper in der Lage ist eine persistierende Infektion auszulösen, sollte die Antigendrift des Virus untersucht werden. Alignments und SimPlot-Analysen der Totalsequenzen verschiedener MNV-Stämme hatten zuvor gezeigt, dass sich innerhalb vom ORF2 ein hypervariabler Bereich befindet (vgl. Abb. 10), weswegen dieser Genombereich analysiert wurde. Zudem kodiert ORF2 für das Kapsidprotein VP1, welches Domänen enthält, die auf der Oberfläche der Viruspartikel lokalisiert sind. Demzufolge verfügt dieses Protein über entsprechende antigene Eigenschaften. Um zu untersuchen, ob die Viren im Rahmen einer persistierenden Infektion ihre antigenen Eigenschaften im ORF2 verändern, wurden aus Kotproben der experimentell infizierten Mäuse, entnommen am Tag 3 und Tag 73, die virale RNA präpariert und mittels nested PCR der ORF2 amplifiziert. Nach dem Klonieren der PCR-Produkte in einen prokaryonten Vektor wurden jeweils 5 Klone sequenziert. Anschließend wurden die Nukleotidsequenzen in die kodierten Proteinsequenzen übersetzt und phylogenetisch untersucht. Abbildung 20 zeigt einen Stammbaum, der die verwandtschaftlichen Beziehungen der ORF2-Proteinsequenzen darstellt. Vergleicht man die AS-Sequenzen der Viren aus einer Maus zu einem bestimmten Zeitpunkt miteinander, so stehen diese in einem engen verwandtschaftlichen Verhältnis zueinander. Dagegen können die ORF2-Proteinsequenzen, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion bestimmt wurden, phylogenetisch voneinander unterschieden werden. Insbesondere bei den Mäusen BI und BII ist deutlich zu erkennen, dass die genetischen Distanzen der Viren während der Persistenz immer größer zu MNV-M21 werden.

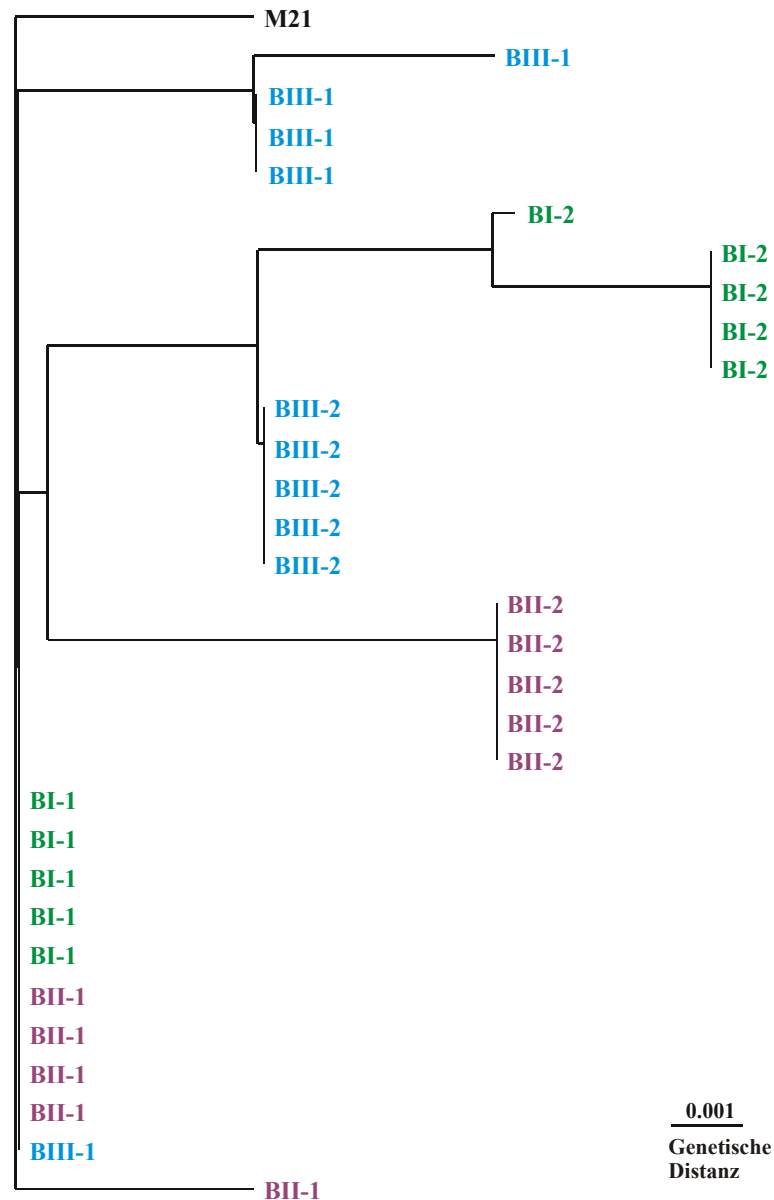


Abbildung 20: Phylogenetische Analyse der AS-Sequenzen von ORF2. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer persistierenden Infektion (1= 3 Tage p.i., 2 = 73 Tage p.i.) wurde virale RNA aus Kotproben der Mäuse (BI-III) isoliert und die Proteinsequenzen von ORF2 ermittelt. Viren, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion einer Maus sequenziert wurden, gruppieren sich auf unterschiedlichen Ästen des Stammbaums. Dies spricht für eine evolutionäre Entwicklung des Virus im Rahmen der Persistenz.

Demgegenüber wurde die genetische Stabilität des murinen Norovirus, ohne den Einfluss des humoralen Immunsystems, überprüft. Dazu wurde das Isolat M21 *in vitro* passagiert. Der Kulturüberstand infizierter RAW 264.7-Zellen wurde verwendet, um naive Zellen zu infizieren. Nach 48 stündiger Inkubation wurde die nächste Passage geerntet um damit wiederum neue Zellen zu infizieren. Dieser Vorgang wurde 14mal wiederholt. Aus den Passagen 5 und 15 wurden die virale

RNA isoliert und, wie schon zuvor beschrieben, die Proteinsequenzen des ORF2 ermittelt. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der passagierten Viren. Während die Viren der Passage 5 (M21-P5) sich phylogenetisch unterscheiden, finden sich in Passage 15 (M21-P15) nunmehr Viren, welche eng miteinander verwandt sind und sich auf einem Ast des Stammbaums gruppieren. Anscheinend kommt es zu einer klonalen Selektion eines einzelnen Virustyps durch die Passagierung *in vitro*. Die Sequenz konnte bereits in der Passage 5 des Isolates nachgewiesen werden.

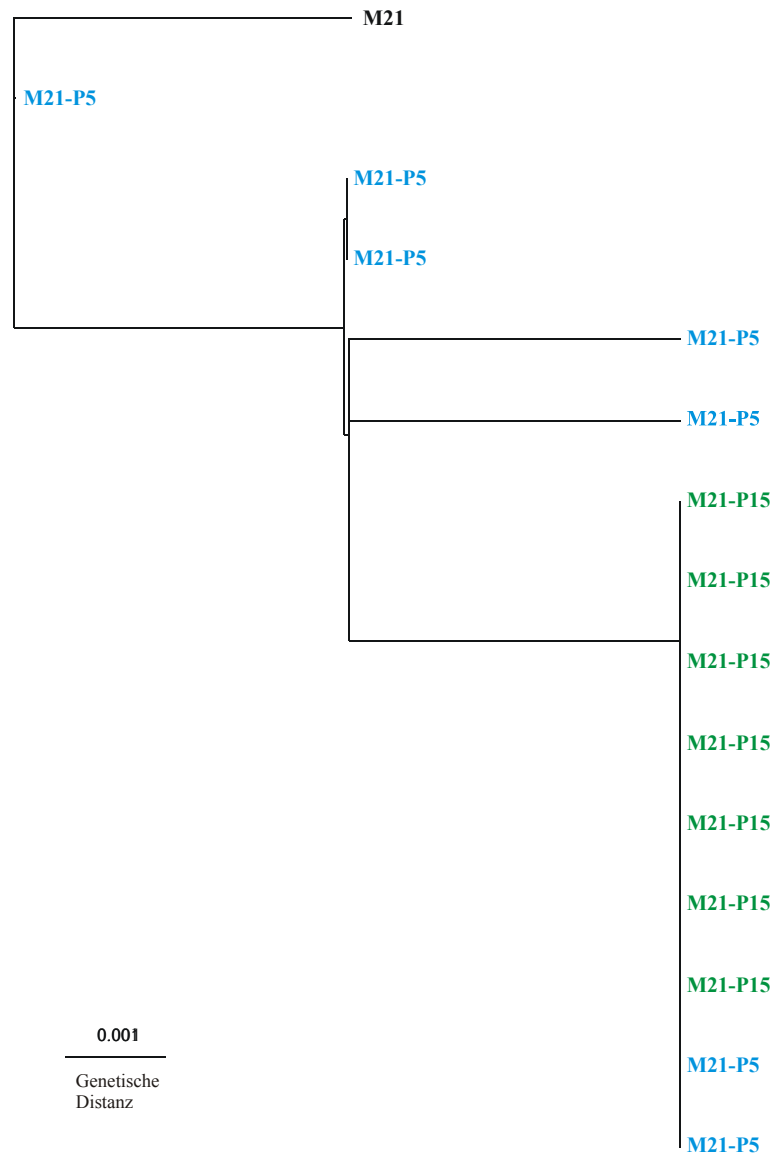


Abbildung 21: Phylogenetische Analyse der ORF2-Proteinsequenzen von *in vitro* passagiertem MNV-M21. Während die Viren aus Passage 5 (M21-P5, blau) genetisch different sind, gruppieren sich die Isolate aus Passage P15 (M21-P15, grün) auf einem Ast des Stammbaums. Es kommt zu einer klonalen Selektion eines bestimmten Virustyps.

Im Folgenden sollte untersucht werden, in welchem Bereich von ORF2 sich die Proteinsequenzen der persistierenden Viren voneinander unterscheiden, aufgrund derer die unterschiedliche phylogenetische

Zuordnung in Abbildung 20 zustande kommt. Dazu wurden, zusätzlich zu den Sequenzen der Viren aus den Wildtyp-Mäusen, auch die ORF2 Sequenzen der persistent infizierten IFN γ -RI^{-/-}-Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 1 und Tag 110) ermittelt. Insgesamt wurden 70 Proteinsequenzen miteinander verglichen und anschließend die Entropie der ORF2-Proteinsequenz bestimmt. Die Entropie ist ein Maß für die Stabilität der Sequenz. Daraus ergeben sich Hinweise auf Bereiche innerhalb von ORF2, welche stärkeren evolutionären Anpassungen unterliegen und somit für die Antigendrift verantwortlich sind. Abbildung 22 stellt die Entropie der ORF2-Proteinsequenz von MNV-M21 dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proteinsequenz im N-terminalen Bereich von ORF2 sehr stabil ist, d.h. hier finden nur wenige Veränderungen statt. Dagegen unterliegt der C-Terminus starker genetischer Entwicklung. Vergleicht man die Entropie der AS-Sequenz mit der strukturellen Organisation des VP1-Proteins, so wird deutlich, dass insbesondere die P2-Domäne hohe Entropiewerte aufweist. Das bedeutet, dass vor allem die Virusoberfläche einer Antigendrift unterliegt.

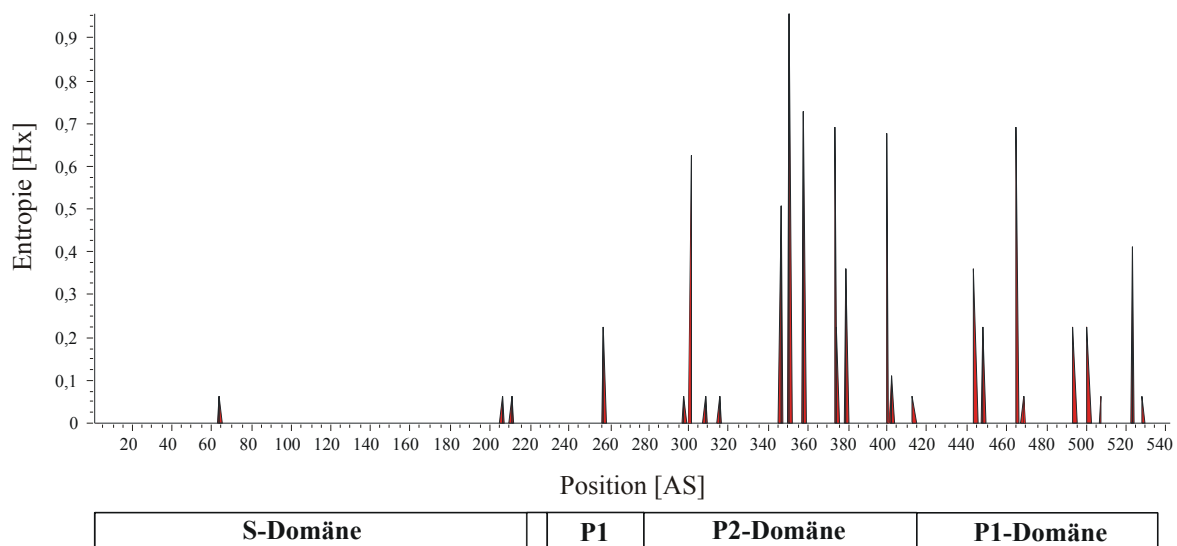


Abbildung 22: Darstellung der Entropie der ORF2-Proteinsequenz von MNV-M21 im Rahmen persistierender Infektionen. Während der N-Terminus nur geringe Entropiewerte aufweist und demzufolge recht stabil ist unterliegt der C-Terminus starker evolutionärer Veränderung. Zur Orientierung ist ein Schema der Unterteilung des VP1-Proteins in die strukturellen Domänen angegeben. (Modifiziert nach Katpally, 2008) Besonders die Sequenz der P2-Domäne unterliegt starken Veränderungen.

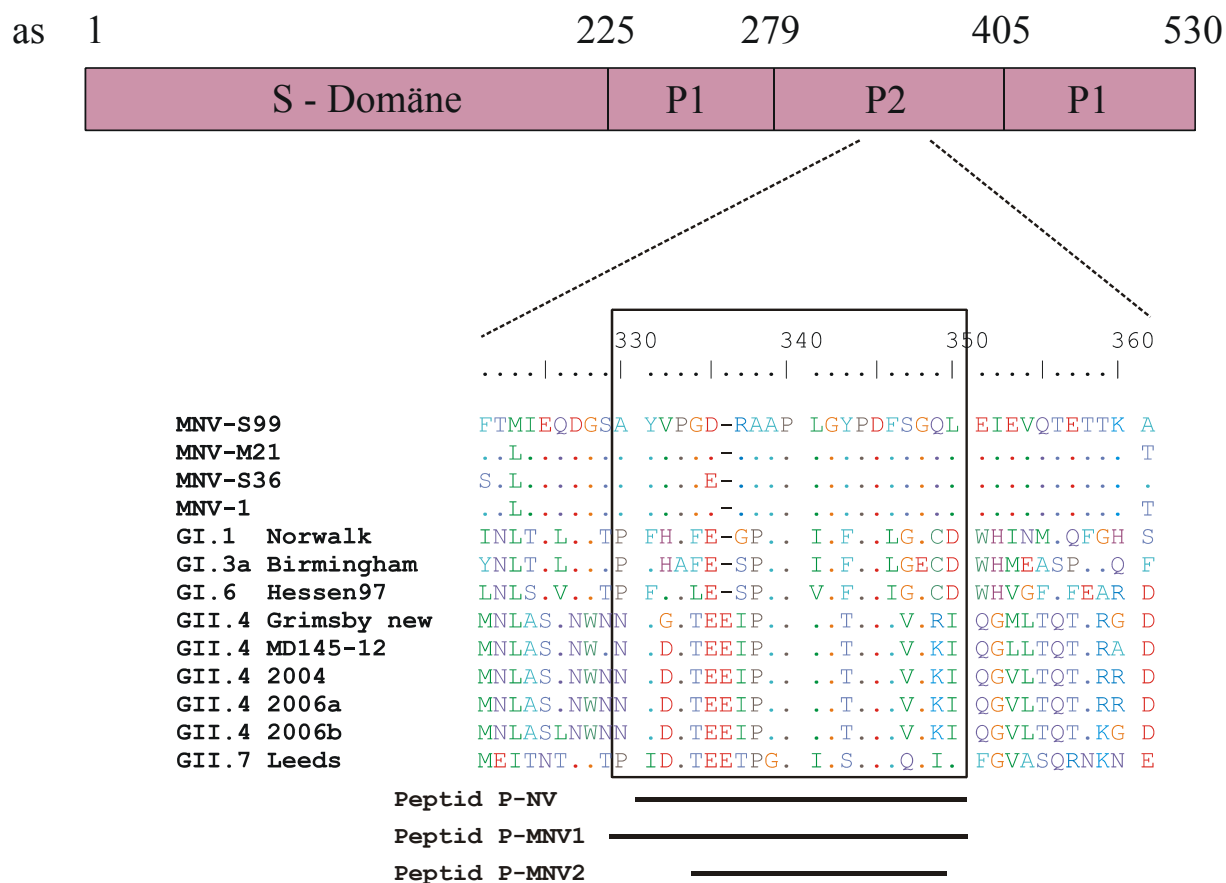


Abbildung 23: Anhand von AS-Alignments der Kapsidproteine einiger Noroviren aus unterschiedlichen Genogruppen kann ein konservierter Sequenzabschnitt identifiziert werden. Die schematische Darstellung der Organisation des NV-VP1-Proteins verdeutlicht die Lokalisation des konservierten Bereichs innerhalb der hypervariablen P2-Domäne. Für die Herstellung spezifischer Antikörper wurden Peptide synthetisiert, welche humane (P-NV) bzw. murine (P-MNV1, P-MNV2) Kapsidsequenzen enthalten.

Im Folgenden sollten die antigenen Eigenschaften dieses Kapsidbereiches untersucht werden. Dazu wurden Peptide synthetisiert, welche die AS-Sequenzen des konservierten Bereichs der humanen Noroviren (P-NV), bzw. die der murinen Noroviren (P-MNV1 und P-MNV2) darstellen. In Abbildung 23 sind die Peptide schematisch dargestellt. Für die Generierung spezifischer Antikörper wurden Kaninchen mit den synthetisierten Peptiden immunisiert. Dabei wurde den Kaninchen das jeweilige Antigen, vermischt mit Freundschens Adjuvants, *subcutan* appliziert und nach mehreren Boosterinjektionen die Hyperimmunseren gewonnen. Als Kontrollantigen wurde das kultivierte und aufgereinigte Isolat MNV-S99 für die Immunisierung verwendet.

3.6.2 Titration der Antiseren im MNV-ELISA

Um die Reaktivität der Hyperimmunseren zu untersuchen, wurden diese zunächst in einem Festphasen-ELISA titriert. Als Antigen diente dabei das Isolat MNV-S99, welches an die feste Phase von Mikrotiterplatten gebunden wurde. Nach Verdünnung der Seren in mehreren Stufen wurden diese auf das Antigen gegeben. Anschließend wurden gebundene Antikörper mittels eines Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Dieser Antikörper erkennt spezifisch das Fc-Fragment der Primärantikörper aus den Antiseren. Mittels einer enzymatischen Farbreaktion kann diese Bindung quantifiziert werden. Die Auswertung des ELISA erfolgt photometrisch, wobei die optische Dichte der Ansätze gemessen wird, welche in indirektem Verhältnis zu der spezifischen Antikörperkonzentration in den Antiseren steht. Die Ergebnisse der ELISAs sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Hyperimmunseren zeigen eine sehr gute Reaktivität gegenüber dem, an die Titerplatten gebundenen, Isolat MNV-S99. Die OD-Werte der Peptidantiseren sind vergleichbar mit denen des Kontrollserums α -MNV-S99, welches durch Immunisierung der Kaninchen mit dem Isolat S99 generiert wurde. Sowohl die Titrationsreihen der Antiseren gegen die murinen Noroviruspeptide (α -P-MNV1, α -P-MNV2) als auch die des Antiserums gegen das humane Noroviruspeptid (α -P-NV) zeigen hohe Konzentrationen spezifischer Antikörper an.

Tabelle 12: Ergebnisse der Titration der Antiseren im MNV-ELISA.

<u>Titerstufe</u>	<u>α-MNV-S99</u>	<u>α-P-MNV1</u>	<u>α-P-MNV2</u>	<u>α-P-NV</u>
1: 1000	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0
1: 2000	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0
1: 4000	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0
1: 8000	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0
1: 16.000	> 3,0	2,393	> 3,0	> 3,0
1: 32.000	2,873	1,702	2,915	> 3,0
1: 64.000	2,779	0,948	2,035	2,802
1: 128.000	2,416	0,531	1,288	2,518
1: 256.000	1,998	0,271	0,742	2,047
1: 512.000	1,393	0,153	0,405	1,437
1: 1.024.000	0,835	0,079	0,203	0,819
Leerwert	0,015	0,017	0,015	0,027

Getestet wurden die Reaktivitäten der Peptidantiseren (α -P-MNV1, α -P-MNV2 und α -P-NV) und des Kontrollantiserums (α -MNV-S99) gegenüber insolubilisiertem MNV-S99. Angegeben sind die OD-Werte, gemessen bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge (620 nm).

3.6.3 Peptidantiseren detektieren MNV-S99 in infizierten Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Antiseren eine sehr hohe Reaktivität gegenüber gebundenen MNV-S99 aufweisen, sollte untersucht werden, inwiefern die darin enthaltenen Peptidantikörper mit nativen MNV-Proteinen, wie sie während einer Infektion in der Zelle gebildet werden, interagieren können. RAW 264.7-Zellen wurden mit MNV-S99 (MOI = 100) infiziert und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen zunächst fixiert, anschließend erfolgte die Inkubation mit einer 1:100 Verdünnung der Peptidantiseren α -P-NV, α -P-MNV1 bzw. α -P-MNV2. Mittels eines Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers, welcher die Peptidantikörper erkennt, kann deren Bindung an die Virusproteine nachgewiesen und im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden (Abbildung 24). Die Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz bestätigt, dass die Peptidantikörper in der Lage sind spezifisch an Virusproteine in infizierten Zellen zu binden. Parallel zu dem MNV-ELISA kann auch in diesem Experiment die intergenotypische Kreuzreaktivität

des Peptidantikörpers, welcher gegen das humane Noroviruskapsid gebildet wurde (α -P-NV), gezeigt werden. In beiden Testsystemen bindet er spezifisch an das MNV-Kapsidprotein.

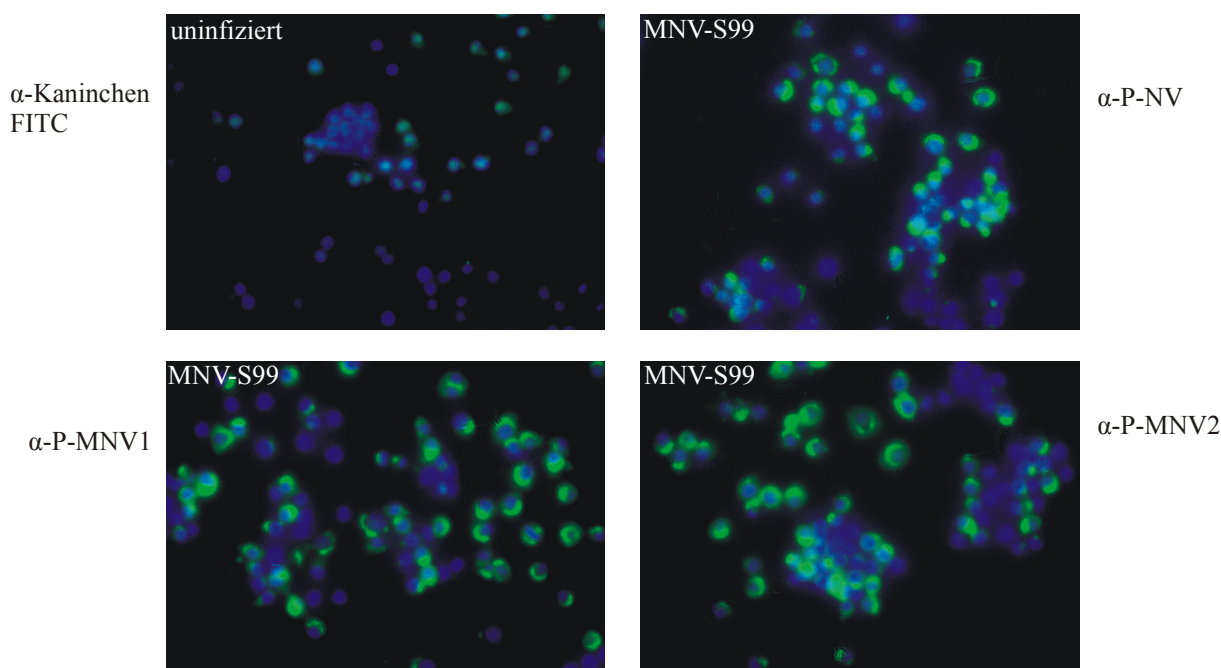


Abbildung 24: Visualisierung der Antikörperbindung mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die Peptidantikörper α -P-NV, α -P-MNV1 und α -P-MNV2 binden spezifisch Virusproteine in MNV-S99 infizierten RAW 264.7-Zellen. Die Bindung wurde mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (grün). Die Zellkerne wurden mit Dapi angefärbt (blau). Zur Kontrolle wurden uninfizierte Zellen mit dem Sekundär-AK gefärbt, um unspezifische Bindung des AKs an Zell- oder Virusproteine ausschließen zu können.

3.6.4 Peptidantiseren im Neutralisationstest

Durch die Bindung von Immunglobulinen können Proteine in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Aufgrund der Anheftung der spezifischen Antikörper an die Virusoberfläche kann zum Beispiel die Interaktion mit dem Rezeptor verhindert und somit eine Infektion unterbunden werden. Durch einen Neutralisationstest können protektive Antikörper, welche in der Lage sind eine Infektion zu verhindern, in Seren von immunisierten Kaninchen nachgewiesen werden. Um die Antiseren auf das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörper zu testen, wurden diese zunächst in mehreren Stufen verdünnt und mit einer definierten Viruskonzentration (MNV-S99-P16; $1:10^4$) inkubiert. Nach erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion wurden RAW 264.7-Zellen zu den Ansätzen gegeben, um die verbliebene Infektiosität der Viren zu überprüfen. Die Auswertung des Neutralisationstestes erfolgte mikroskopisch anhand des Auftretens eines cytopathogenen Effektes bei erfolgter Infektion. Wird

aufgrund von neutralisierenden Antikörpern die Infektion verhindert bleiben die Zellen intakt. Die Serumverdünnungen dienen der Bestimmung der Antikörpertiter (Endpunkttitration). In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Neutralisationstests in einem Säulendiagramm zusammengefasst. Die Konzentration der neutralisierenden Antikörper in den Peptidseren wird indirekt anhand der reziproken Titerstufe der Endpunktbestimmung dargestellt. Zur Kontrolle wurden Neutralisationstests mit den Seren der Kaninchen durchgeführt, die vor Durchführung der Immunisierung entnommen wurden (Präimmunserum). Während sich die Antiseren der Kaninchen, immunisiert mit dem Peptid P-NV und P-MNV1, hinsichtlich der neutralisierenden Eigenschaften kaum von den Präimmunseren unterscheiden, finden sich in den Hyperimmunseren α -P-MNV2 deutlich erhöhte Konzentrationen protektiver Antikörper. Die Reaktivitäten dieser Hyperimmunseren sind vergleichbar mit den neutralisierenden Eigenschaften der Seren jenes Kaninchens, welches mit dem Isolat MNV-S99 immunisiert wurde.

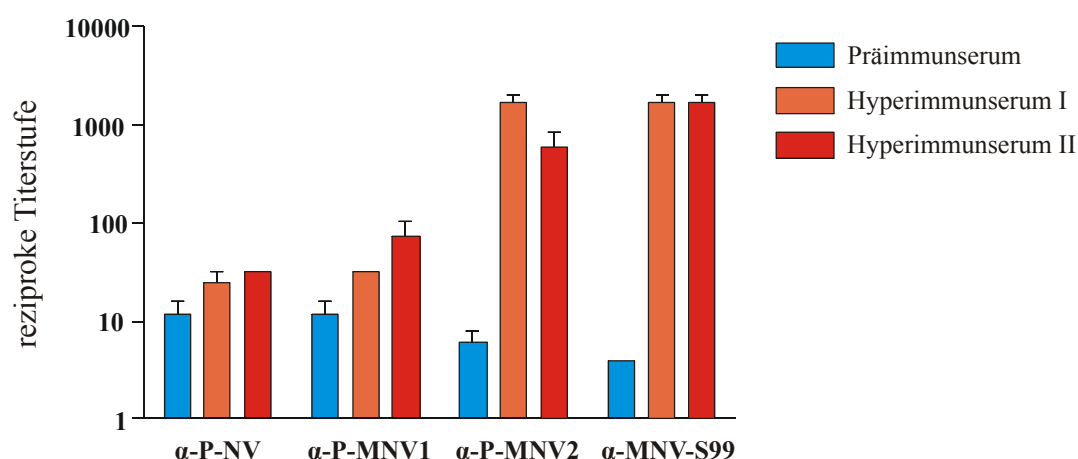


Abbildung 25: Nachweis neutralisierender Antikörper in den Peptidantisera. Kaninchen wurden mit den synthetisch hergestellten Peptiden P-NV, P-MNV1 und P-MNV2 bzw. dem Isolat MNV-S99 immunisiert. Vor (Präimmunserum) und nach Immunisierung (Hyperimmunserum I und II) wurde mittels Neutralisationstest die Konzentration protektiver Antikörper in den Seren bestimmt (n=3). In den Hyperimmunseren α -P-MNV2 und α -MNV-S99 ist die Konzentration neutralisierender Antikörper im Vergleich zu den Präimmunseren deutlich erhöht.

3.6.5 Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber verschiedenen Norovirus Genogruppen

Da die Antikörper gegen Peptide generiert wurden, die einen intertypisch konservierten Bereich innerhalb von Norovirus-Kapsidproteinen darstellen, sollte in den folgenden Experimenten die Kreuzreaktivitäten der Peptidantikörper überprüft werden.

Zunächst wurden die Antiseren im Westernblot eingesetzt, um die Reaktivitäten der Peptidantikörper gegenüber denaturierten und linearisierten Kapsidproteinen zu testen. Dazu wurden rekombinant hergestellte Kapsidproteine der Genogruppen GI, GII, und als Kontrolle die Proteine des Isolats MNV-S99, unter denaturierenden Bedingungen in einem PAA-Proteingel aufgetrennt und anschließend mittels Elektrottransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden mit einer Verdünnung der Antiseren inkubiert, um die Peptidantikörper mit den Proteinen interagieren zu lassen. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte anhand eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers. Durch Zugabe eines entsprechenden Substrates kommt es dann zu einer Chemolumineszenz, die durch Belichtung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden kann. Somit stellt sich die Antikörperbindung als Schwärzung auf dem Film dar (Abbildung 26). Während die Westernblots die spezifische Bindung der Peptidantikörper an das VP1 Protein von MNV bestätigen (vgl. Tab. 12), unterscheiden sich die Antiseren in den Reaktivitäten gegenüber den unterschiedlichen Kapsidproteinen von humanen Noroviren. Der Peptidantikörper α -P-NV bindet an die Kapsidproteine der Genogruppe GII (GII.4 und GII.7), aber nicht an die der Genogruppe GI (GI.1 und GI.6). Im Gegensatz dazu reagiert der Antikörper α -P-MNV1 sehr gut mit den Proteinen der Genogruppe GI, aber nur schwach mit Genogruppe GII. Der Antikörper α -P-MNV2 hingegen bindet, mit vergleichbarer Intensität, an alle getesteten Kapsidproteine und hat demzufolge sehr gute kreuzreaktive Eigenschaften.

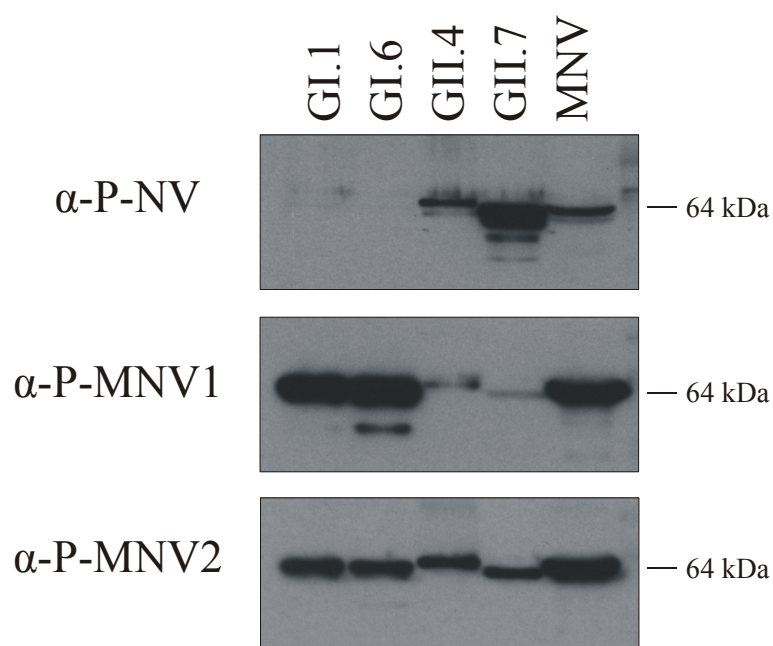


Abbildung 26: Westernblot zur Darstellung kreuzreaktiver Peptidantikörper. Rekombinant hergestellte Norovirus-Kapsidproteine der Genotypen GI.1, GI.6, GII.4 und GII.7 wurden in einem Proteingel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels der Antiseren detektiert. Während sich die Antikörper α -P-NV und α -P-MNV1 in der Reaktivität gegenüber der Genogruppen GI und GII unterscheiden, zeigt α -P-MNV2 eine gute Kreuzreaktivität. Zur Kontrolle wurden die Reaktivitäten der Peptidantikörper gegen das MNV-Kapsidprotein bestätigt.

Des Weiteren wurden die Kreuzreaktivitäten der Antiseren im Festphasen-ELISA getestet. Rekombinant hergestellte Kapsidproteine wurden an die feste Phase der Mikrotiterplatten gebunden und anschließend durch Titration der Antiseren detektiert. Die Auswertung der ELISAs erfolgt, wie in 3.6.2 beschrieben, photometrisch anhand einer antikörperabhängigen Farbreaktion. In Abbildung 27 sind die Titrationskurven der Antiseren graphisch dargestellt. Zum Vergleich sind die Titrationskurven der Peptidantikörper gegen insolubilisiertes MNV-S99 (vgl. Tab. 12) angegeben (Abb. 27a). Wie auch schon im Immunoblot zeigt α -P-NV eine deutliche Reaktivität gegenüber dem GII.7 Kapsidprotein, wohingegen GI.1 nur schwach gebunden wird. Die Titrationskurven von α -P-MNV1 ergeben sehr gute Reaktivitäten gegenüber den Kapsidproteinen GI.1 und GII.4 im ELISA, was im Gegensatz zu den Ergebnissen des Westernblot steht, da dort die Bindung an GII.4 deutlich reduziert war. Die schwache Reaktivität von α -P-MNV1 gegen GII.7 wird in beiden Experimenten bestätigt. Die Titrationskurven von α -P-MNV2 zeigen ebenfalls Diskrepanzen bezogen auf die Bindungseffizienzen in den unterschiedlichen Experimenten. Während die Bindung des Peptidantikörpers an GI.1 und GII.4 bestätigt wird, ist die Reaktivität von α -P-MNV2 gegen GII.7 im ELISA deutlich reduziert.

Demgegenüber konnten im Westernblot keine quantitativen Unterschiede bei der Bindung an die unterschiedlichen Antigene festgestellt werden.

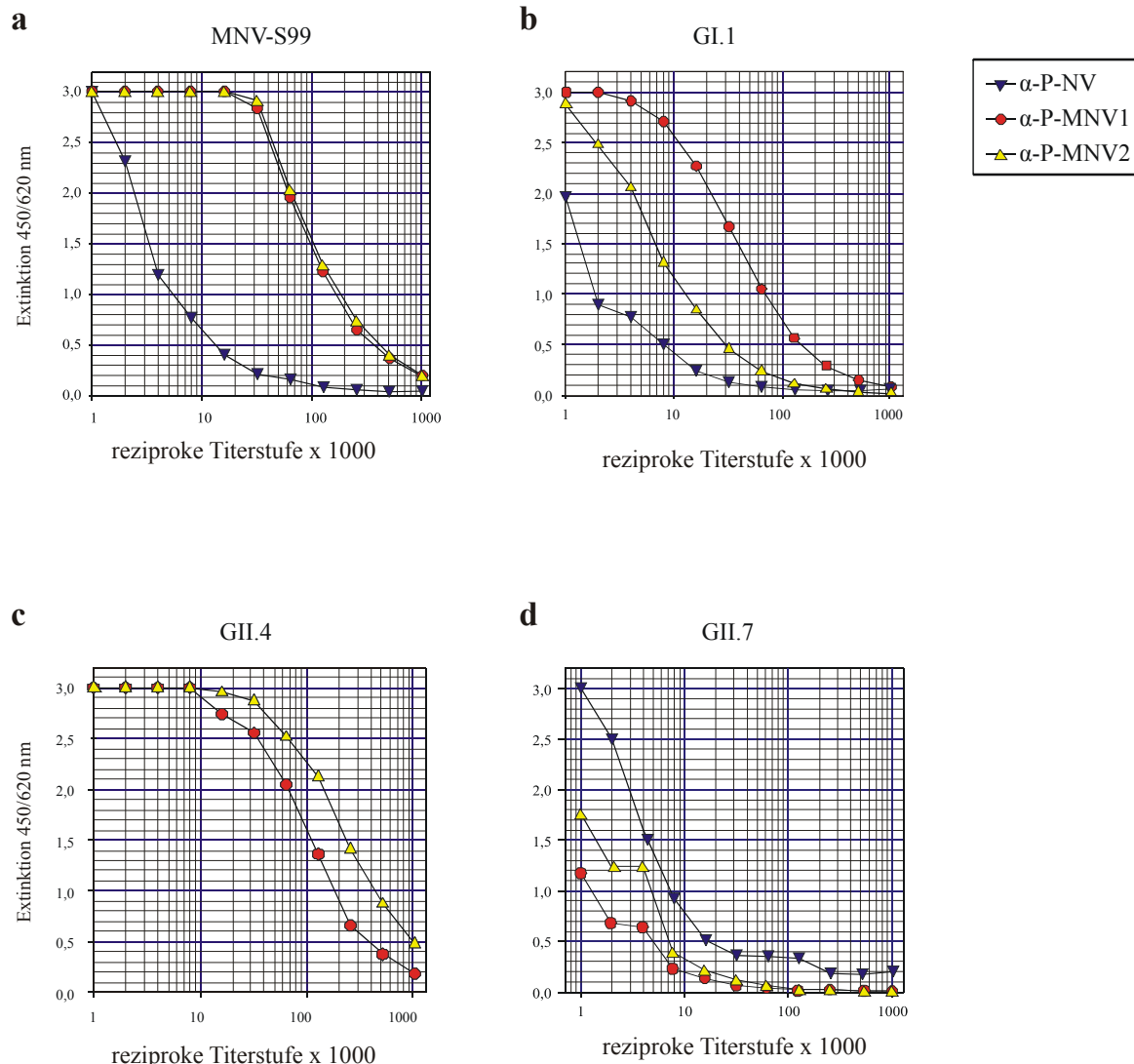


Abbildung 27: Nachweis kreuzreaktiver Peptidantikörper im Festphasen-ELISA. Für die Titration der Antiseren wurden rekombinant hergestellte Kapsidproteine der NV Genotypen GI.1 (b), GII.4 (c) und GII.7 (d) und die feste Phase gebunden. Zum Vergleich ist die Titration der Seren gegen insolubilisiertes MNV-S99 (a) angegeben. Dargestellt sind die Titrationskurven der Antiseren α-P-NV (blau), α-P-MNV1 (rot) und α-P-MNV2 (gelb).

4 Diskussion

Prävalenz genetisch differenter muriner Noroviren

Nach der Entdeckung und erstmaligen Beschreibung eines Norovirus, welches Mäuse infiziert, wurden mehr als 12000 Labormäuse in den USA und Kanada untersucht. Mittels dieser Seroprävalenzstudie ist gezeigt worden, dass MNV eines der am häufigsten vorkommenden murinen Pathogene ist. In 22,1% der untersuchten Seren wurden Antikörper gegen MNV-1 gefunden (Hsu, 2005). Basierend auf diesen Hintergrundinformationen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Prävalenz von MNV in Labormäusen in Berlin untersucht. Mittels *real-time* PCR konnte das Virus in 55% der 82 untersuchten Kotproben nachgewiesen werden. Auffällig ist die unerwartet hohe Prävalenz von MNV in den Tieren, im Vergleich zu den Daten aus Nordamerika. Die Verwendung unterschiedlicher diagnostischer Methoden könnte ursächlich für diese deutlichen Unterschiede sein. Während in dieser Arbeit ein direkter Erregernachweis durchgeführt wurde, erfolgte der Nachweis einer Infektion in der Vergleichsstudie indirekt anhand von spezifischen Antikörpern in den Seren der Labormäuse. Es besteht die Möglichkeit, dass nicht alle infizierten Mäuse Antikörper gegen MNV ausbilden oder die Seren zu einem Zeitpunkt der Infektion entnommen wurden, an dem es noch zu keiner messbaren humoralen Immunantwort gekommen ist. Eine zeitabhängige Reduktion der Antikörpertiter nach einer Infektion oder mangelnde Kreuzreaktivitäten (unterschiedliche Serotypen) könnten ebenfalls eine Rolle spielen. Vergleichbare Untersuchungen bezüglich der humoralen Immunantwort bei humanen Noroviren zeigen, dass gebildete protektive Antikörper virusspezifisch sind und der Schutz vor Neuinfektionen zudem zeitlich begrenzt ist (Matsui, 2000; Parrino, 1977).

Überraschend ist die Höhe der MNV-Prävalenz in Labormäusen, die ansonsten unter keimfreien Bedingungen gehalten werden. Das Potential, persistierende Infektionen zu induzieren (Hsu, 2006, eigene Beobachtungen), die hohe Umweltresistenz der Viren (Cannon, 2006) und die fäkal-orale Transmissionsroute (Wobus, 2006) können zu dieser hohen Prävalenz beigetragen haben. Zudem konnten bei keiner der infizierten Mäuse Krankheitssymptome festgestellt werden, was in Einklang mit der Beschreibung weiterer MNV-Stämme (MNV2-4) steht (Hsu, 2006) und außerdem zu einer unbemerkten Verbreitung des Virus beigetragen haben könnte.

Im Gegensatz dazu zeigten RAG2^{-/-}/Stat1^{-/-} Mäuse, die mit MNV-1 infiziert waren, einen letalen Krankheitsverlauf assoziiert mit Meningitis, zerebraler Vaskulitis, Hepatitis und Pneumonie (Karst, 2003; Ward 2006). Die Frage, inwiefern die Ausprägung der Immundefizienz oder aber unterschiedliche Pathogenitäten der Virusstämme ursächlich für die Ausbildung einer letalen Infektion sind, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig beantworten. Einerseits zeigten Wildtyp-Mäuse nach Inokulation mit MNV-1 keine Krankheitssymptome, andererseits verdeutlichten molekulare Charakterisierungen, dass dieses Virus genetisch different zu den Stämmen MNV2-4 und den hier untersuchten neuen Stämmen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der

Infizierbarkeit und dem Genotyp der Mäuse festgestellt werden. Es wurden keine Hinweise auf unterschiedliche MNV-Prävalenzen bei immundefizienten, transgenen oder Wildtyp-Mäusen gefunden. Für eine statistisch verwertbare Aussage ist die Anzahl der untersuchten Proben allerdings zu gering.

Als diagnostische Methode zum Nachweis einer MNV-Infektion wurde in dieser Arbeit zunächst eine *real-time* PCR etabliert, die nicht nur den Nachweis sondern auch die Quantifizierung der viralen Genome in Kotproben ermöglicht. Morphologische und genetische Untersuchungen der Proben S36 und M21 haben bestätigt, dass sich in den Kotproben intakte Viruspartikel befinden, die eindeutig als murine Noroviren charakterisiert wurden. Durch *in-vitro*-Kultivierungen und anschließende *per orale* Infektionen von Wildtyp-Mäusen mit dem Isolat M21 konnte gezeigt werden, dass ausgeschiedene Viruspartikel infektiös sind und zudem die fäkal-orale Transmissionsroute bestätigt werden. Die Quantifizierung der Genomäquivalente in den Proben lässt allerdings nur indirekt eine Aussage über die Menge der infektiösen Partikel zu (Baert, 2008, eigene Beobachtungen). Die Anzahl der infektiösen Partikel ist geringer als der quantifizierte *viral load* in den Kotproben (Faktor 10 – 100). Eine Erklärung dafür ist, dass mittels der *real-time* PCR auch die Genome defekter oder nicht-infektiöser Partikel nachgewiesen werden können. In den Viruspartikeln können sich, neben dem viralen Genom, auch subgenomische RNAs befinden, die aufgrund der Lokalisation der Primerbindungsstellen innerhalb von ORF2 ebenfalls detektiert werden. Diese Diskrepanz zwischen dem *viral load* und der tatsächlichen Infektiosität einer Probe wurde auch schon bei anderen Viren, zum Beispiel den Enteroviren, beschrieben (Kopecka, 1993).

Die Gattung der Noroviren zeichnet sich durch hohe genetische Diversitäten aus. Anhand von molekulargenetischen Methoden können die verwandtschaftlichen Beziehungen der Stämme analysiert werden, aufgrund derer dann eine Klassifizierung der Viren erfolgt. So wird diese Virusgattung in 5 verschiedene Genogruppen aufgeteilt, innerhalb derer zusätzlich genetische Cluster unterschieden werden. Die humanen Noroviren werden den Genogruppen GI, GII und GIV zugeordnet, bovine Noroviren der Genogruppe GIII und MNV-1 ist der Prototyp der neuen Genogruppe GV (Ando, 2000; Katayama, 2002; Zheng, 2006). Die phylogenetischen Analysen in dieser Arbeit zeigen, dass die Viren innerhalb der Genogruppe der murinen Noroviren, vergleichbar zu denen der humanen Noroviren oder auch anderer Caliciviren, genetische Diversitäten aufzeigen, die eine weitere Unterteilung in genetische Cluster ermöglichen. Diese Clustereinteilung wird anhand der Sequenzen von verschiedenen Viren in zwei subgenomischen Bereichen unabhängig voneinander bestätigt. Die hier untersuchten MNV-Stämme wurden mittels der Stammbäume in vier neue genetische Cluster eingeteilt, die sich deutlich von den Stämmen MNV1-4 differenzieren. Viren innerhalb eines Clusters haben Sequenzhomologien von 0-7,7% (ORF1) bzw. 0-4,9% (ORF2). Das Muster der Clustereinteilung ist vergleichbar mit den Divergenzen von Sapoviren (SV), einer weiteren Gattung aus der Familie *Caliciviridae* (Schuffenecker, 2001). Insbesondere die Distanzen zwischen den Clustern der ORF2-Sequenzen sind dabei vergleichbar, was für engere verwandtschaftliche

Verhältnisse bzw. eine höhere evolutionäre Stabilität der Viren innerhalb dieser beiden Genogruppen spricht. Demgegenüber sind die humanen Noroviren deutlich divergenter, was Ausdruck einer bereits länger andauernden Evolution und/oder eines höheren Selektionsdrucks sein könnte. Die Sequenzheterogenitäten dieser RNA-Viren sind vermutlich das Ergebnis einer hohen Mutationsrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, welche nicht über eine *proofreading*-Funktion verfügen kann.

Homologe Rekombination

Der Begriff „homologe Rekombination“ beschreibt die Entstehung von hybriden RNA-Viren, bei der homologe Elternstränge involviert sind, beziehungsweise *crossovers* in homologen Bereichen der Virusgenome stattfinden können (Lai, 1992). Als zugrunde liegender Mechanismus der Rekombination von RNA-Viren wird das *copy-choice* Modell favorisiert. Dieses Modell wurde erstmals aufgrund eines Rekombinationsereignisses bei Polioviren vorgeschlagen und konnte inzwischen anhand mehrerer experimenteller Systeme bestätigt werden (Copper, 1974; Nagy & Simon, 1997). Hintergrund dieses Modells ist, dass die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase während der Genomreplikation von einem RNA-Molekül zu einem anderen wechselt und so hybride RNAs (Virusgenome) gebildet werden können. Wenn die Replikase dabei mit dem Kopieren des neuen Stranges exakt an der Position fortfährt, an der sie den alten Strang verlassen hat, resultiert dies in einer neuen, replikationsfähigen Generation.

Die Entstehung rekombinanter Virusstämme, deren Genome Abschnitte unterschiedlicher evolutionärer Herkunft beinhalten, ist von großer Bedeutung bei der genetische Klassifizierung von Viren. Neben der hohen Fehlerrate der Polymerase tragen demnach auch intertypische Rekombinationsereignisse entscheidend zu der genetischen Diversität und Variation der RNA-Viren bei (Worobey & Holmes, 1999). Besondere Vorsicht ist daher bei der Bewertung von phylogenetischen Stammbäumen geboten, welche lediglich aufgrund von einzelnen Genomausschnitten berechnet wurden. Es ist nicht immer praktikabel, die komplette Sequenz eines Genoms für die phylogenetischen Analysen zu bestimmen. Fehlerhafte Klassifizierungen können jedoch vermieden werden, indem alternativ mehrere repräsentative Genomausschnitte sequenziert und analysiert werden. In dieser Arbeit wurden daher je ein Ausschnitt aus dem ORF1, bzw. dem ORF2 der Viren amplifiziert und sequenziert. Die verwandtschaftlichen Verhältnisse der einzelnen Amplifikate zueinander wurden dann anschließend parallel und unabhängig voneinander untersucht. Tatsächlich konnten aufgrund der phylogenetischen Analysen dieser subgenomischen Bereiche hybride MNV-Stämme identifiziert werden. Unterschiedliche Gruppierungen dieser Viren in Abhängigkeit von dem untersuchten Genomabschnitt ließen Rekombinationsereignisse vermuten. Weiterführende Charakterisierungen der betreffenden Stämme mittels SimPlot-Analysen bestätigten die homologen Rekombinationen. Aufgrund vergleichbarer molekulargenetischer Untersuchungen von humanen Sapoviren sowie von bovinen und humanen Noroviren konnten homologe Rekombinationsereignisse

auch schon bei anderen Vertretern der Caliciviren nachgewiesen werden (Ambert-Balay, 2005; Bull, 2005; Han, 2004; Hansman, 2005; Katayama, 2002; Schreier, 2000). In diesen Studien, einschließlich der hier beschriebenen, hat die Rekombination in einem homologen Sequenzbereich im Übergang von ORF1 zu ORF2, der *junction* Region, stattgefunden.

Mehrere theoretische *copy-choice* Modelle postulieren einen Zusammenhang zwischen der Synthese subgenomischer RNAs und der homologen Rekombination von RNA-Viren. Sie basieren auf der Vermutung, dass komplexe Sekundärstrukturen, wie sie zum Beispiel von dem subgenomischen Promoter in der ORF1/ORF2 *junction* Region gebildet werden, den Switch der Polymerase von einem Strang zum nächsten begünstigen können (Kim & Kao, 2001). Die Bildung eben solcher subgenomischer RNAs bei murinen und humanen Noroviren und die beschriebene Rekombination in der *junction* Region bestärken diese Theorie (Simmonds, 2008; Bull, 2005). Andererseits wurden auch Rekombinationsereignisse an anderer Stelle des Genoms von humanen Noroviren beschrieben (Rohayem, 2005; Waters, 2007). SimPlot-Analysen von Rekombinanten, welche in dieser Arbeit *in vitro* generiert wurden, zeigen dementsprechend, dass in diesem Modellsystem die homologe Rekombination innerhalb der ORF2-Kapsidsequenz stattgefunden hat.

In dieser Arbeit konnte erstmals die homologe Rekombination von Noroviren *in vitro* dargestellt werden. Die Möglichkeit, homologe Rekombination von RNA-Viren unter kontrollierten Bedingungen zu simulieren, kann entscheidend dazu beitragen, zugrunde liegende Mechanismen aufzuklären. Durch gezielte Manipulationen einzelner Faktoren könnte deren Einfluß auf die homologe Rekombination überprüft werden. Die Synthese einer subgenomischen RNA, die Bildung von sekundären RNA-Strukturelementen und deren Rolle bei der Rekombination von Noroviren kann so im Modellsystem dargestellt und getestet werden. Eine Simulation der Rekombination unter Verwendung vollständig charakterisierter Isolate ermöglicht die Überprüfung der Frage, ob intertypische Rekombination auch an anderen Stellen des MNV-Genoms stattfindet oder inwiefern lediglich der Austausch von kurzen Genomabschnitten möglich ist.

Funktionale Aspekte der Klassifizierung

Abgesehen von epidemiologischen und evolutionären Untersuchungen ist die Subklassifizierung einer Virusgruppe in genetische Cluster nur dann von größerer Bedeutung, wenn funktionale Aspekte diese detaillierte Klassifizierung bestärken. So können Viren einer Gattung beispielsweise zusätzlich durch unterschiedliche antigene Eigenschaften (Serogruppen) oder aufgrund ihrer Pathogenese differenziert werden. Bei den humanen Noroviren sind derartige Informationen mangels eines Kultivierungssystems limitiert beziehungsweise auf die Anwendung rekombinant hergestellter Viruspartikel (VLPs) oder Replikonsysteme reduziert. Dagegen können murine Noroviren auf einer monozytären Zelllinie kultiviert werden (Wobus, 2004) und ermöglichen so eine genauere

Untersuchung ihrer pathogenen Eigenschaften. Ein Ansatzpunkt der *in vitro* Charakterisierung von MNV-Isolaten aus unterschiedlichen Clustern war in dieser Arbeit die Detektion von eventuell unterscheidbarem Replikationsverhalten der Viren. Tatsächlich konnten Unterschiede bei den Replikationseffizienzen genetisch differenter MNVs nachgewiesen werden. Während MNV-S99 und MNV-1 in diesen Experimenten höhere Endpunkttiter erreichten und zudem bereits nach 48h ein 100%iger cpe der infizierten Zellen beobachtet wurde, waren die Titer des Isolates MNV-M21 um den Faktor 100 geringer und die vollständige Lyse der Zellen wurde erst nach 72h erreicht. Für die Stämme MNV-2, MNV-3 und MNV-4 wurden ähnliche Unterschiede beschrieben. So bildeten MNV-3 und MNV-4 ebenfalls bereits nach 48h einen 100%igen cpe aus, während MNV-2 diesen erst nach 72h erreichte (Hsu, 2005). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Stammbäumen der Teilsequenzen (insbesondere ORF2), wird deutlich, dass unterschiedliche Wachstumskinetiken mit den verwandtschaftlichen Beziehungen der Virusstämme korrelieren. Viren mit vergleichbarem Replikationsverhalten sind enger miteinander verwandt und lassen sich auch phylogenetisch von Viren mit differenten Kinetiken unterscheiden.

IFN β -Sensitivität

Für MNV-1 konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass die Pathogenese dieses Virus abhängig von der Typ-I-Interferon gesteuerten antiviralen Immunantwort ist (Karst, 2003; Wobus 2004; Chang & George, 2007). Es wurde beschrieben, dass MNV-1-infizierte Zellen Typ-I-Interferone sezernieren und dass außerdem die Replikation von MNV-1 durch Vorinkubation der Zellen mit 50 Units IFN α deutlich reduziert wird. Nachdem in dieser und in anderen Arbeiten ein unterschiedliches Replikationsverhalten genetisch differenter MNVs *in vitro* gezeigt werden konnten, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass diese Ergebnisse auf unterschiedliche Sensitivitäten der Isolate gegenüber Typ-I-Interferon hinweisen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Replikationsverhalten der Stämme MNV-1, MNV-S99 und MNV-M21 in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von IFN β untersucht. Bei isolierter Betrachtung der Viruskonzentrationen nach 36h zeigt sich bei allen Isolaten eine vergleichbar deutliche Reduktion der Titer in Abhängigkeit der IFN β -Konzentrationen. Das Replikationsverhalten dieser Stämme wird gleichermaßen durch IFN β beeinträchtigt. Dagegen kann ein Unterschied in den Verläufen der Wachstumskinetiken festgestellt werden. Durch die Zugabe von 10 bzw. 25 Units IFN β , zeigt MNV-S99 eine zeitlich verzögerte Wachstumskurve, was darauf hinweist, dass dieses Isolates insbesondere in der frühen Phase der Replikation sehr sensitiv auf das Interferon reagiert. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigen aber nicht die Hypothese, dass die unterschiedlichen Replikationseffizienzen der Stämme *in vitro* Ausdruck verschiedener IFN β -Sensitivitäten sind. Ein Aspekt, der in diesen Experimenten allerdings nicht berücksichtigt wird, ist die Möglichkeit, dass aufgrund der Infektionen mit unterschiedlichen Stämmen auch unterschiedliche Mengen an endogenen Typ-I-Interferonen gebildet werden können,

wodurch ebenso das Replikationsverhalten der Stämme beeinflusst würde. Es konnte bereits für mehrere Viren ein *escape* Mechanismus beschrieben werden, welcher die Supprimierung der zellulären IFN-Antwort beinhaltet (Garcia-Sastre, 2006; Haller, 2006). Um also den genaueren Zusammenhang zwischen Replikationsverhalten und IFN β -Sensitivität der Viren zu verstehen, sind weiterführende Experimente, die unterschiedliche Aspekte der Interaktion zwischen Virus und Zelle betrachten, notwendig.

Zusammengefasst unterstützen diese *in vitro* Charakterisierungen der MNV-Stämme jedoch eine Subklassifizierung der Genogruppe GV, da diese Viren nicht nur phylogenetisch, sondern auch hinsichtlich ihrer Pathogenitäten unterscheidbar sind.

Persistenz von Noroviren und *Immune escape*

Aufgrund regelmäßiger Überprüfungen von Kotproben natürlich infizierter IFN γ -R^{-/-}-Mäuse konnte eine andauernde Virusausscheidung und damit eine persistierende Infektion dieser Tiere mit MNV-M21 nachgewiesen werden. Dabei wurde ein gleichbleibender *viral load* über einen Zeitraum von 110 Tagen in den Kotproben detektiert. Durch die Isolation des Virus und anschließende orale Infektion von Wildtyp-Mäusen konnte gezeigt werden, dass MNV-M21 auch in dem neuen Wirt persistiert. Die Persistenz ist somit ein Pathogenitätsmerkmal des Virus und bildet sich nicht aufgrund des Genotyps des Primärwirts aus. Die Immundefizienz der IFN γ -R^{-/-}-Mäuse hat allenfalls zur Persistenz beigetragen ist aber nicht ihre Ursache. Eine andauernde fäkale Virusausscheidung und damit eine persistierende Infektion von Wildtyp-Mäusen konnte auch für die murinen Noroviren MNV-2, MNV-3 und MNV-4 gezeigt werden (Hsu, 2006). In dieser Vergleichsstudie wurde den Tieren ebenfalls *in vitro* kultiviertes Virus oral appliziert und die Ausscheidung anschließend für einen Zeitraum von 8 Wochen mittels PCR überprüft. Interessanterweise konnte MNV-1 nach oraler Inokulation von Wildtyp-Mäusen nicht oder nur für kurze Zeit (max. 7 Tage) in den Kotproben der Tiere nachgewiesen werden (Hsu, 2006; Karst, 2003). Demgegenüber induziert MNV-1 in RAG1^{-/-}-Mäusen ebenfalls eine persistierende Infektion (Karst, 2003). Dieses differente Persistenzverhalten der Stämme deutet darauf hin, dass die Pathogenität von MNV-1 eine andere ist, als die von MNV-2, MNV-3, MNV-4 und dem in dieser Arbeit beschriebenen MNV-M21.

Im Fall von MNV-1 lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Persistenz auf den Genotyp des Wirts zurückzuführen ist. Mäuse, in denen eines der *rag*-Gene (RAG1 / RAG2) ausgeschaltet ist, unterliegen einer kompletten Blockade ihrer lymphozytären Entwicklung. Demzufolge können diese Tiere keine Antikörper und T-Zell Rezeptoren ausbilden. Da MNV-1 in diesen Tieren persistiert, wird vermutet, dass die adaptive Immunantwort essentiell für die Klärung der Infektion ist. Einerseits konnte diese Hypothese in einer Folgearbeit bekräftigt werden (Chachu, 2008), andererseits könnten einzelne Punkte diese aber auch widerlegen. Zum einen wurden in der Vergleichsstudie (Hsu, 2006) und auch

in der oben genannten Folgearbeit (Chachu, 2008) für die Infektion der Mäuse *in vitro* kultiviertes MNV-1 verwendet. Bei diesem Isolat wurden unterschiedliche Attenuierungsmutationen beschrieben (Wobus, 2004; Bailey, 2008). Diese Mutationen könnten Ursache für die mangelnde Persistenz von MNV-1 in den Wildtyp-Mäusen sein. Zum anderen wurde durch die intraperitoneale Gabe von MNV-spezifischen Antikörpern eine Reduktion, nicht aber die vollständige Elimination von MNV-1 in RAG1^{-/-}-Mäusen erreicht (Bailey, 2008). Da diese Tiere im Folgenden nicht mehr auf eine Virusausscheidung hin untersucht wurden, konnte eine Klärung der Infektion nicht endgültig gezeigt werden.

Demgegenüber induzieren MNV-M21 sowie MNV2-4 persistierende Infektionen in Wildtyp-Mäusen. In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass MNV-M21 dabei ungeachtet der Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern in der Lage ist im Wirt zu persistieren. Auch während der Infektion von Wildtyp-Mäusen mit MNV2-4 werden spezifische Antikörper gebildet (Hsu, 2006). Die humorale Immunantwort ist somit nicht ausreichend, um die Infektion des Wirtes zu beenden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass MNV-M21 durch Veränderung der antigenen Eigenschaften (Antigendrift) der adaptiven Immunantwort entgehen kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sich die Proteinsequenz von VP1 im Verlauf der Persistenz verändert. AS-Substitutionen waren dabei hauptsächlich in der P2-Domäne des Kapsidproteins lokalisiert. Im Gegensatz dazu zeichnet sich die VP1-Sequenz von M21 bei einer parallel durchgeführten *in vitro* Passagierung des Virus durch hohe Stabilität aus. Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse für eine immuninduzierte Evolution von ORF2. Vergleichbar zu den humanen Noroviren ist die P2-Domäne auf der Virusoberfläche lokalisiert und spielt höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Rezeptorbindung (Tan, 2003; Katpally, 2008). Für MNV-1 konnte gezeigt werden, dass eine einzelne Punktmutation innerhalb dieser Domäne ausreicht, um die spezifische Bindung eines neutralisierenden Antikörpers aufzuheben (Wobus, 2004; Lochridge & Hardy, 2007). Aufgrund der Bildung neutralisierender Antikörpern unterliegen die Viren einem Selektionsdruck. Veränderungen der antigenen Eigenschaften ermöglichen somit die Viruspersistenz, was als *escape* Mechanismus angesehen werden kann. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch bei einem anderen Mitglied der *Caliciviridae*, dem feline Calicivirus, gemacht. Dies ist ein respiratorisches Virus bei Katzen, welches ebenfalls persistierende Infektionen ausbilden kann (Radford, 1998).

Das humane Norovirus bildet in der Regel keine persistierenden Infektionen aus. Bei 26% zufällig ausgesuchter Patienten konnte allerdings eine länger andauernde Virusausscheidung nachgewiesen werden (Rockx, 2002). Bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem kann es ebenfalls zu einer untypischen, andauernden Virusausscheidung kommen (Goller, 2004; Lee, 2008; Simon, 2006). Untersuchungen bei einem chronisch infizierten Patienten ermöglichten es, die Mutationsrate von NV darzustellen. Dabei konnten ebenfalls hauptsächlich Veränderungen in der hypervariablen P2-Domäne gezeigt werden (Nilsson, 2003). Die beschriebenen Mutationen bewirkten eine strukturelle Änderung der Domäne, was womöglich die Ausbildung eines neuen Phänotyps mit veränderten antigenen

Eigenschaften bedeutet. Studien bezüglich der Evolution von NV lassen vermuten, dass die Persistenz des humanen Norovirus GII.4 in der Bevölkerung ebenso auf Antigendrift der P2-Domäne zurückzuführen ist (Allen, 2008; Lindesmith, 2008; Siebenga, 2007).

Antigene Eigenschaften und Grundlagen der Impfstoffentwicklung

Betrachtet man die stetig steigende Zahl der Norovirusinfektionen weltweit, stellt sich die Frage der Notwendigkeit eines Impfstoffes. Zwar ist der Verlauf einer Infektion vergleichsweise harmlos und von kurzer Dauer, bei Kleinkindern und älteren Menschen kann es aber aufgrund der starken Dehydrierung zu fatalen Verläufen kommen. Die wachsende Zahl der älteren Bevölkerung begünstigt das Auftreten von Ausbruchserkrankungen, was nicht zuletzt auch eine bedeutende ökonomische Komponente beinhaltet. Eine Impfung, zunächst von Risikogruppen (Kinder, Alte, Krankenhaus- und Pflegepersonal), könnte helfen, die hohen Prävalenzen und Inzidenzen deutlich zu reduzieren. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die aufgrund einer Infektion erworbene Immunität gegen humane Noroviren kurzweilig und außerdem relativ Virusstamm-spezifisch ist (Matsui & Greenberg, 2000). Persistenzuntersuchungen lassen zudem eine immungesteuerte virale Evolution vermuten (s.o. Nilsson, 2003). Ein Ansatz der Impfstoffentwicklung könnte daher die Identifikation von Virusstrukturen sein, die stabil aus evolutionärer Sicht sind, d.h. keiner Antigendrift unterliegen und aufgrund ihrer antigenen Eigenschaften die Bildung von protektiven Antikörpern bewirken. Diese sollten eine Infektion neutralisieren können und gleichzeitig möglichst kreuzreaktiv gegenüber verschiedenen Virusstämmen sein.

In dieser Arbeit konnte ein Sequenzbereich innerhalb des VP1 Proteins von Noroviren identifiziert werden, welcher diesen Kriterien entspricht. Die Gegebenheit, dass die Aminosäuresequenz in diesem Bereich zwischen allen untersuchten Genogruppen (GI, GII und GV) konserviert ist, spricht für eine sehr hohe genetische Stabilität. Diese konservierte Sequenz ist in der P2-Domäne von ORF2 lokalisiert. Proteinstrukturen, welche von dieser Domäne gebildet werden, befinden sich auf der Oberfläche von Viruspartikeln und besitzen antigene Eigenschaften. Zudem befinden sich innerhalb dieser Domäne Strukturen, welche höchstwahrscheinlich für die Rezeptorbindung zuständig sind. Daher können spezifische Antikörper, welche diese Strukturen erkennen, die Rezeptorbindung blockieren und so eine Infektion der Zielzelle verhindern. Durch Immunisierungen von Kaninchen mit synthetischen Peptiden wurden Antikörper gegen den beschriebenen Bereich generiert. Es wurden Peptide verwendet, die zum einen MNV spezifische (P-MNV1, P-MNV2), und zum anderen NV spezifische (P-NV) Sequenzen enthielten. Alle Peptid-Antikörper zeigten deutliche Reaktivitäten gegenüber MNV und konnten mit dem Virus in verschiedenen Testsystemen interagieren (ELISA, IFA). Allerdings war nur der Antikörper, welcher gegen P-MNV2 generiert wurde, in der Lage, die Infektion von MNV zu neutralisieren. Interessanterweise wurde parallel zu dieser Arbeit die Bindestelle eines neutralisierenden monoklonalen Antikörpers, welcher gegen MNV-1 generiert wurde

(MAb A6.2.1; Wobus, 2004), gemappt und es zeigte sich, dass dieser Antikörper dasselbe Epitop im Kapsid bindet, wie α -P-MNV2 (Lochridge & Hardy, 2007).

In weiteren Experimenten wurden die Kreuzreaktivitäten der Antikörper gegenüber verschiedenen Norovirus-Kapsidproteinen analysiert. Dabei wurden zunächst die Reaktivitäten der Antikörper gegen denaturierte VP1-Proteine im Westernblot getestet. Die Peptidantikörper detektierten gleichermassen MNV, unterschieden sich aber in ihren Reaktivitäten gegenüber den NV-Kapsidproteinen. Während α -P-NV und α -P-MNV1 unterschiedliche Bindungsspezifitäten hinsichtlich der Genogruppen GI und GII aufwiesen, zeigte α -P-MNV2 sehr gute kreuzreaktive Eigenschaften. Im Gegensatz dazu reagierten die Antikörper α -P-NV und α -P-MNV1 im ELISA mit Proteinen, welche sie zuvor im Westernblot nicht detektieren konnten. Diese unterschiedlichen Spezifitäten in Abhängigkeit von dem verwendeten Testsystem weisen darauf hin, dass die Bindung der Antikörper α -P-NV und α -P-MNV1 von der Konformation der Kapsidproteine beeinflusst wird. Die Abhängigkeit der Antikörperbindung von der Proteinstruktur wurde auch für den monoklonalen Antikörper A6.2 vermutet (Wobus, 2004), da dieser ebenfalls natives Virus erkennen kann, nicht aber linearisiertes Kapsidprotein im Westernblot detektiert.

Untersuchungen bezüglich der antigene Eigenschaften von humanen Sapoviren haben gezeigt, dass die Spezifitäten im ELISA davon abhängen, ob es sich um einen Antigen- oder einen Antikörper-ELISA handelt (Hansmann, 2007). Während im Antikörper-ELISA, wie er auch in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, die Seren Kreuzreaktivitäten gegen unterschiedliche Antigene zeigten, konnten die unterschiedlichen antigenen Eigenschaften der Kapside im Antigen-ELISA differenziert werden. Die kreuzreaktiven Bindungseigenschaften der Antikörper α -P-NV und α -P-MNV1 im Antikörper-ELISA sollten demnach mit entsprechenden Antigen-ELISAs verifiziert werden.

Demgegenüber sind die Bindungsspezifitäten des Antikörpers α -P-MNV2 unabhängig von der Struktur bzw. dem durchgeführten Testsystem. Der hier beschriebene konservierte Bereich innerhalb der P2-Domäne beinhaltet demzufolge ein Epitop, welches geeignet ist, spezifische Antikörper herzustellen, die sowohl mit Noroviren verschiedener Genogruppen kreuzreagieren und zudem in der Lage sind, eine Infektion zu neutralisieren. In zukünftigen Studien könnte daher untersucht werden, inwiefern sich dieses Epitop für eine Impfstoffentwicklung eignen würde.

5 Literaturverzeichnis

- Adler JL, Zickl R** Winter vomiting disease. *Journal of Infectious Diseases* 1969, *119*: 668-673.
- Allen DJ, Gray JJ, Gallimore CI, Xerry J, Iturriza-Gomara M** Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS ONE* 2008, *3*: e1485.
- Ambert-Balay K, Bon F, Le Guyader F, Pothier P, Kohli E** Characterization of new recombinant noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, *43*: 5179-5186.
- Ando T, Noel JS, Fankhauser RL** Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *Journal of Infectious Diseases* 2000, *181*: 336-348.
- Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK** Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, *102*: 10327-10332.
- Baert L, Wobus CE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M** Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, *74*: 543-546.
- Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA** Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging Infectious Diseases* 2005, *11*: 1079-1085.
- Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinjé J** Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection* 2006, *69*: 2761-2765.
- Chachu KA, Strong DW, LoBue AD, Wobus CE, Baric RS, Virgin HW** 4th Antibody is critical for the clearance of murine norovirus infection. *Journal of Virology* 2008, *82*: 6610-6617.
- Chang KO, George DW** Interferons and Ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *Journal of Virology* 2007, *81*: 12111-12118.
- Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Green KY** Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* 2006, *353*: 463-473.
- Copper PD, Steiner-Pryor A, Scotti PD, DeLong D** On the nature of poliovirus genetic recombinants. *Journal of General Virology* 1974, *23*: 41-49.
- Dales S, Eggers HJ, Tamm I, Palade GE** Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology* 1965, *26*: 379-389.

- Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME** The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO Journal* 2003, 22: 2852-2859.
- Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME** VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology Journal* 2006, 3: 33.
- Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK** Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology* 2004, 85: 79-87.
- Felsenstein J** PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 1989, 5: 164-166.
- Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Xerry J, Adigwe J, Gray JJ** Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants. *Archives of Virology* 2007, 152: 1295-303.
- García-Sastre A, Biron CA** Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente. *Science* 2006, 312: 879-882.
- Goller JL, Dimitriadis A, Tan A, Kelly H, Marshall JA** Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *The Journal of Hospital Infection* 2004, 58: 286-291.
- Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberte JF, Roberts L** Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Reports* 2005, 6: 968-972.
- Granzow H, Schirrmeier H** Electron microscopy for direct detection of 32-nm particles in faeces of calves with diarrhea. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 1985, 40: 228-229.
- Günther H, Otto P** Diarrhea in young calves. 7. "Zackenvirus" (Jena agent 117/80) - a new diarrhea pathogen in calves. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin* 1987, 41: 934-938.
- Hall TA** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999, 41: 95-98.
- Haller O, Kochs G, Weber F** The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 2006, 344: 119-130.

- Han MG, Smiley JR, Thomas C, Saif LJ** Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42: 5214-5224.
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N** Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Reviews in Medical Virology* 2007, 17: 133-141.
- Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N** Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerging Infectious Diseases* 2007, 13: 1519-1525.
- Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K** Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerging Infectious Diseases* 2005, 11: 1916-1920.
- Herbert TP, Brierley I, Brown TD** Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *The Journal of General Virology* 1997, 78: 1033-1040.
- Hsu CC, Riley LK, Livingston RS** Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes* 2007, 34: 147-155.
- Hsu CC, Riley LK, Wills HM, Livingston RS** Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comparative Medicine* 2006, 56: 247-251.
- Hsu CC, Wobus CE, Steffen EK, Riley LK, Livingston RS** Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2005, 12: 1145-1151.
- Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK** Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *Journal of Virology* 2003, 77: 405-415.
- Johnston CP, Qiu H, Ticehurst JR, Dickson C, Rosenbaum P, Lawson P, Stokes AB, Lowenstein CJ, Kaminsky M, Cosgrove SE, Green KY, Perl TM** Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clinical Infectious Diseases* 2007, 45: 534-540.
- Kapikian AZ** The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *The Journal of Infectious Diseases* 2000, 181 (Suppl. 2): 295-302.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM** Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology* 1972, 10: 1075-1081.

- Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW 4th** STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003, 299: 1575-1578.
- Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N** Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002, 299: 225-239.
- Katpally U, Wobus CE, Dryden K, Virgin HW 4th, Smith TJ** Structure of antibody-neutralized murine norovirus and unexpected differences from viruslike particles. *Journal of Virology* 2008, 82: 2079-2088.
- Kim MJ, Kao C** Factors regulating template switch in vitro by viral RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98: 4972-4977.
- Kimura M** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980, 16: 111-120.
- Kopecka H, Dubrou S, Prevot J, Marechal J, Lopez-Pila JM** Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59: 1213-1219.
- Lai MM** RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews* 1992, 56: 61-79.
- Lee BE, Pang XL, Robinson JL, Bigam D, Monroe SS, Preiksaitis JK** Chronic norovirus and adenovirus infection in a solid organ transplant recipient. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2008, 27: 360-362.
- Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinjé J, Baric RS** Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Medicine* 2008, 5: e31.
- Lochridge VP, Hardy ME** A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *Journal of Virology* 2007, 81: 12316-12322.
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC** Full-length immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology* 1999, 73: 152-160.

- Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, Buesa J, Schreier E, Reacher M, Brown D, Gray J, Iturriza M, Gallimore C, Bottiger B, Hedlund KO, Torvén M, von Bonsdorff CH, Maunula L, Poljsak-Prijatelj M, Zimsek J, Reuter G, Szücs G, Melegh B, Svennson L, van Duynhoven Y, Koopmans M** Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 2004, *363*: 682-688.
- Love DN, Sabine M** Electron microscopic observations of feline kidney cells infected with a feline calicivirus. *Archives of Virology* 1975, *48*: 213-228.
- Matsui SM, Greenberg HB** Immunity to calicivirus infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2000, *181*: 331-335.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ** Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 1991, *184*: 677-686.
- Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, Heimann-Nichols ER, Wobus CE, Reilly MJ, Moghadamfalahi M, Shukla D, Karst SM** Murine norvirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *Journal of Virology* 2007, *81*: 3251-3263.
- Nagy PD, Simon AE** New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 1997, *235*: 1-9.
- Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, Svensson L** Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *Journal of Virology* 2003, *77*: 13117-13124.
- Page RD** TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 1996, *12*: 357-358.
- Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR** Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *The New England Journal of Medicine* 1977, *297*: 86-89.
- Platanias LC** Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 2005, *5*: 375-386.
- Radford AD, Turner PC, Bennett M, McArdle F, Dawson S, Glenn MA, Williams RA, Gaskell RM** Quasispecies evolution of a hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. *The Journal of General Virology* 1998, *79*: 1-10.

- Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR** Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol.* 2002, *23*: 96-101.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz J** Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978, *15*: 261-267.
- Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M** Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases* 2002, *35*: 246-253.
- Rohayem J, Münch J, Rethwilm A** Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *Journal of Virology* 2005, *79*: 4977-4990.
- Schreier E, Döring F, Künkel U** Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Archives of Virology* 2000, *145*: 443-453.
- Schuffenecker I, Ando T, Thouvenot D, Lina B, Aymard M** Genetic classification of "Sapporo-like viruses". *Archives of Virology* 2001, *146*: 2115-2132.
- Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E** Animal noroviruses *The Veterinary Journal* 2008, Article in press.
- Sharp TW, Hyams KC, Watts D, Trofa AF, Martin GJ, Kapikian AZ, Green KY, Jiang X, Estes MK, Waack M, et al.** Epidemiology of Norwalk virus during an outbreak of acute gastroenteritis aboard a US aircraft carrier. *Journal of Medical Virology* 1995, *45*: 61-67.
- Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS** Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Archives of Virology* 2007, *152*: 457-461.
- Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, Koopmans M** Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *Journal of Virology* 2007, *81*: 9932-9941.
- Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG** Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Research* 2008, *36*: 2530-2546.
- Simon A, Schildgen O, Maria Eis-Hubinger A, Hasan C, Bode U, Buderus S, Engelhart S, Fleischhack G** Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2006, *41*: 693-699.

- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Prikhodko VG, Thackray LB, Wobus CE, Karst SM, Virgin HW, Green KY** Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *Journal of Virology* 2006, *80*: 7816-7831.
- Souza M, Azevedo MS, Jung K, Cheetham S, Saif LJ** Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *Journal of Virology* 2008, *82*: 1777-1786.
- Souza M, Cheetham SM, Azevedo MS, Costantini V, Saif LJ** Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *Journal of Virology* 2007, *81*: 9183-9192.
- Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA** In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases* 13, 396-403.
- Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S** Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Archives of Virology* 1998, *143*: 1215-1221.
- Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X** Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *Journal of Virology* 77, 12562-12571.
- Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, Liu B, Alegre ER, Henderson KS, Kelley ST, Virgin HW** 4th Murine norovirus comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *Journal of Virology* 2007, *81*: 10460-10473.
- van Der Poel WH, Vinjé J, van Der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP** Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerging Infectious Diseases* 2000, *6*: 36-41.
- Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ** Porcine norovirus related to human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases* 2005, *11*: 1874-1881.
- Ward JM, Wobus CE, Thackray LB, Erexson CR, Faucette LJ, Belliot G, Barron EL, Sosnovtsev SV, Green KY** Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. *Toxicologic Pathology* 2006, *34*: 708-715.
- Waters A, Coughlan S, Hall WW** Characterisation of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene. *Virology* 2007, *363*: 11-14.

- Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, Charles M, Chege W, Isakbaeva E, Wright JG, Mintz E, Forney D, Massey J, Glass RI, Monroe SS** Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of noroviruses - United States, 2002 *The Journal of Infectious Diseases* 2004, *190*: 27-36.
- Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, Salehi ED, Swanson E, Totaro J, Woron R, Mead PS, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI** Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerging Infectious Diseases* 2005, *11*: 95-102.
- Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug A, Mackenzie JM, Green KY, Virgin HW** Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology* 2004, *2*: e432.
- Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW** 4th Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *Journal of Virology* 2006, *80*: 5104-5112.
- Woode GN, Bridger JC** Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *Journal of Medical Microbiology* 1978, *11*: 441-452.
- Worobey M, Holmes EC** Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *The Journal of General Virology* 1999, *80*: 2535-2543.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS** Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006, *346*: 312-323.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidisulfat
as	antisense
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
Casp.	Caspase
CAST	Calpastatin
CCL3	Chemokin, Motiv CC, Ligand 3
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
cpe	cytopathischer Effekt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid (Adenosin, Cytosin, Guanosin, Tymidin)- Triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FCV	felines Calicivirus
FKS	fötales Kälberserum

GFAP-BLC	<i>glial fibrillary acidic protein-B-lymphocyte chemo-attractant</i>
ID ₅₀	infektiöse Dosis (50%)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
ITAC	<i>interferon-inducible T-cell alpha-chemoattractant</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertrani-Medium
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LyZ	Lysozym M
MNV	murines Norovirus
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
nt	Nukleotid
NV	humanes Norovirus
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PBS ₀	<i>phosphat buffered saline</i> ohne Mg ²⁺ - und Ca ²⁺ -Ionen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
Pol	Polymerase

Pro	Protease
PSEN	Presenilin
RAG	<i>recombination-activating gene</i>
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RHDV	<i>rabbit haemorrhagic disease virus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	sense
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SDS	Natrium (<i>sodium</i>) dodecylsulfat
SRA	<i>scavenger</i> Rezeptor A
SSC	<i>sodium chloride/sodium citrate (buffer)</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tg	transgen
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VPg	<i>viral protein, genome-linked</i>
wt	Wildtyp
YFPH	<i>yellow fluorescent protein H</i>

Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Code):

A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	T	Threonin
E	Glutaminsäure	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	Y	Tyrosin
H	Histidin	Q	Glutamin		

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zeitliche Darstellung gemeldeter Noroviruserkrankungen in Deutschland.....	9
Abb. 2: Phylogenetische Analyse der <i>Caliciviridae</i> (Scipioni, 2008).	11
Abb. 3: Genomorganisation von MNV-1.....	13
Abb. 4: Schematische Darstellung der <i>real-time</i> PCR.....	19
Abb. 5: Klonierungs- und Sequenzierungsstrategie zur Erstellung von MNV-Totalsequenzen.	24
Abb. 6: Graphische Darstellung der Verteilung positiv bzw. negativ getesteter Proben im Max Planck- und Robert Koch-Institut.	48
Abb. 7: CsCl-Gradienten der Proben S36 und M21.	50
Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Probe M21.	51
Abb. 9: Stammbaum der MNV-Genomsequenzen.	53
Abb. 10: SimPlot-Analyse des murinen Norovirus S36.	55
Abb. 11: Phylogenetische Analyse der Teilsequenzen aus ORF1 (RNA-Polymerase) und ORF2 (VP1).	57
Abb. 12: SimPlot-Analysen der Rekombinanten S28 und MNV-4.	59
Abb. 13: Gelelektrophoretische Analyse der hyperspezifischen PCRs zur Charakterisierung von Rekombinationsereignissen <i>in vitro</i>	61
Abb. 14: SimPlot-Analysen der <i>In-vitro</i> -Rekombinanten.	63
Abb. 15: Wachstumskinetiken der Virusstämme MNV-1, S99 und M21.	65
Abb. 16: Wachstumskinetiken der Stämme M21, S99 und des Referenzvirus MNV-1 in Abhängigkeit verschiedener IFN β -Konzentrationen.	66
Abb. 17: MNV-M21 persistiert in natürlich infizierten IFN γ -RI ^{-/-} -Mäusen.	68
Abb. 18: M21-Virus persistiert in Wildtyp-Mäusen (Bl6) nach oral induzierter Infektion.	69
Abb. 19: Neutralisationstest.....	70
Abb. 20: Phylogenetische Analyse der AS-Sequenzen von ORF2.	72
Abb. 21: Phylogenetische Analyse der ORF2-Proteinsequenzen von <i>in vitro</i> passagiertem MNV-M21.	73

Abb. 22: Darstellung der Entropie der ORF2-Proteinsequenz von MNV-M21 im Rahmen persistierender Infektionen.	74
Abb. 23: Anhand von AS-Alignments der Kapsidproteine einiger Noroviren aus unterschiedlichen Genogruppen kann ein konservierter Sequenzabschnitt identifiziert werden.	76
Abb. 24: Visualisierung der Antikörperbindung mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	78
Abb. 25: Nachweis neutralisierender Antikörper in den Peptidantiseren.	79
Abb. 26: Westernblot zur Darstellung kreuzreaktiver Peptidantikörper.	81
Abb. 27: Nachweis kreuzreaktiver Peptidantikörper im Festphasen-ELISA.	82

6.3 Oligonukleotide

Alle hier aufgelisteten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung wurden von der Firma BioTez Berlin-Buch GmbH bezogen. Die Oligonukleotide wurden vom Hersteller, frei von Schutzgruppen, durch Gel-Filtration gereinigt und lyophilisiert, geliefert. Von allen Primern wurde eine Stammlösung (100 µM) angesetzt und bei -20°C gelagert.

Name / Orientierung		Sequenz	Lokalisierung
sense (s)	antisense (as)	(5' - 3')	ORF / nt*
aTag	as	gCC AAC gAC Cgg gAg gCC AgC	
mnv-3	as	gCg gAA TTC CTA TgC CCT gCT ACT CCC gAT C	3 7286-7307
mnv-4	s	TgC TAC CCA ggA TCA AgA gg	2 5565-5584
mnv-5	s	ACC CTg ATT gAg CAg gAT gg	2 5578-5997
mnv-6	s	gCg gAA TTC ACC ATg gCT ggT gCT CTT TTT gg	3 6681-6700
mnv-8	as	gCT gCC CCA TCA gAg TgA g	3 6843-6861
mnv-9	as	gCA AgT CgA CCA TCC ggT Ag	2 5733-5752
mnv-10	s	TCT TCT TgA TgT gCg TCg Ag	2 5535-5554
mnv-11	as	CgT gCA CAg CCg Cgg CTg TAT C	2 5757-5778
mnv-14	s	gTg AAA TgA ggA Tgg CAA CgC CAT CTT CTg	1 1 - 30
mnv-23	s	CgC Agg AAC gCT CAg CAg TC	1 5029-5048
mnv-25	as	ggA AgA TCC Agg ggT CAA TTT gg	2 5202-5224
mnv-27	as	ggA ACA AgA TCC Tgg CCg CTg	2 5102-5123
mnv-28	s	TCT ACC ACT ACT CTg TCT AC	1 448-467
mnv-29	as	CgC ACT TCC TCA ACT CAg CC	1 593-612
mnv-30	s	gCC CTg ATT CTC CTT gCT g	1 933-951
mnv-31	s	Tgg CTA ggA TTA gCA Tgg C	1 1426-1444
mnv-32	s	CAT gAg gCC AgA CTA CAg CC	1 1949-1968

mnv-33	s	TCA CCT CCA TCC TgC Agg C	1	2452-2470
mnv-34	s	TTg ACT ggA ATg Tgg TTg gC	1	2911-2930
mnv-35	s	AAC ACC Tgg gTT gTg ATT gg	1	3432-3451
mnv-36	s	ACC Agg CCA CCC ATg CCA AC	1	3970-3989
mnv-37	s	CCC TgC ACC ACA CAg CTg	1	4452-4469
mnv-38	as	CCT AAC TCT gCC ATC CAC CAg	2	6211-6231
mnv-39	as	CTC ggg AAT CAC ATC CTg g	2	6258-6276
mnv-42	s	CAT gTT CTg gCg CAC CTC gCC	1	3626-3646
mnv-43	as	CgC gAA gAT gAA ggg CCC ATC	1	4215-4235
mnv-44	s	CCg CCT TgA gAA CAC CCT Yg	1	3821-3840
mnv-45	as	gCA gCT Cgg ATC ATg gTg CC	1	4113-4132
T7		AAT ACg ACT CAC TAT Agg g		
M13rev		CAg gAA ACA gCT ATg AC		

* bezogen auf die Totalsequenz von MNV-1 (Genbank-Nr.: AY228235)

6.4 Genbanknummern der veröffentlichten Sequenzen

Teilsequenzen

Virusstamm	Mauslinie	Genbank-Nr. ORF1	Genbank-Nr. ORF2
S6	IFN- γ RI ^{-/-}	EF531578	EF531588
S11	Myd 88 ^{-/-}	EF531579	EF531589
S15	RAG 1 ^{-/-}	EF531580	EF531590
S28	TLR 4 ^{-/-}		EF531292
S29	TLR 2/4 ^{-/-}	EF531581	EF531596
S31	TLR 2/4 ^{-/-}	EF531582	EF531594
S37	CD1 wt	EF531583	EF531597
S74	Galectin 3 ^{-/-}	EF531584	EF531592
S90	GFAP-BLC tg	EF531585	EF531595
S93	ITAC (A) ^{-/-}	EF531586	EF531591
S97	ITAC (B) ^{-/-}	EF531587	EF531593

Totalsequenzen

Virus	Mauslinie	Genbank-Nr.
MNV Berlin 04/06/DE Stamm M21	IFN- γ RI ^{-/-}	DQ911368
MNV Berlin 05/06/DE Stamm S36	RAG 1 ^{-/-}	EF531290
MNV Berlin 06/06/DE Stamm S99	YFPH tg	EF531291

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Detlev Krüger möchte ich mich für die Betreuung und Unterstützung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herr PD Dr. Eckart Schreier für die wissenschaftliche Anleitung und engagierte Betreuung bedanken. Besonders unsere zahlreichen Gespräche über „Gott und die Welt“ werden mir in guter Erinnerung bleiben.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Uwe Klemm. Ohne ihn und sein Team wäre ein großer Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Silvia und Tomas Porstmann für die Zusammenarbeit bei der Erstellung und Charakterisierung der Antikörper bedanken.

Frau Dr. Marina Höhne danke ich für die Bereitstellung der NV-Kapsidproteine.

Frau Dr. Sabine Diedrich und Herrn Dr. Andreas Mas Marques danke ich für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Was wäre ein Labor, ohne die fleissigen TAs? Ein riesen Dank an Ute Pätzold, Katrin Stanossek, Sonja Zimmermann und Daniela Gutt.

Nicht zuletzt möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern des Robert Koch-Institutes danken, wobei ich vor allem das Sequenzierteam und die Abteilung ZBS4 erwähnen möchte.

Lebenslauf

- **Persönliche Daten**

Birthe Müller

geboren am 17.04.1973 in Gütersloh

deutsche Staatsangehörigkeit, ledig

- **Bildungsgang**

2005 – 2008 **Doktorandin** am Robert Koch Institut, Berlin

2004 **Diplomarbeit** am Institut für Klinische und Molekulare Virologie,
Erlangen
Titel: *Bedeutung N-terminaler Sequenzen des HTLV-1 Tax-Proteins für die Zellzyklus-Stimulation.*

1999 – 2004 **Studium** der Molekularen Medizin an der Friedrich-Alexander
Universität, Erlangen – Nürnberg

1992 Abitur am Städtischen Gymnasium, Gütersloh

- **Berufliche Tätigkeiten**

1995 – 1999 Anstellung als BTA an der Friedrich-Alexander Universität,
Erlangen – Nürnberg

1992 – 1994 Staatliche Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin an der
Bernd-Blindow Schule, Bückeburg

- **Publikationen**

2007 Müller B., Klemm U., Mas Marques A., Schreier E.
Genetic diversity and recombination of murine noroviruses in immunocompromised mice. Archives of Virology (2007) 152: 1709 - 1719

2005 Fraedrich K., Müller B., Grassmann R.
The HTLV-1 Tax protein binding domain of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) includes the regulatory PSTAIRE helix. Retrovirology, 2005 Sept 15; 2:54

Publikation

Genetic diversity and recombination of murine noroviruses in immunocompromised mice

B. Müller, U. Klemm, A. Mas Marques, E. Schreier

Archives of Virology (2007); 152 (9): 1709 - 19

Murine noroviruses (MNV) are newly identified pathogens which infect laboratory mice. In this study, we found a high prevalence (64.3%) of MNV in various breeding colonies of immunocompromised, transgenic and wild-type mouse lines. All mice survived infection with no signs of clinical disease. Faeces samples were collected from animals housed in two separate laboratory mouse colonies in Berlin, Germany, and screened using quantitative reverse transcription (RT)-PCR. We have determined the complete nucleotide sequence of 3 novel MNV strains. Furthermore, we sequenced two subgenomic regions within open reading frames (ORFs) 1 and 2 that are suitable for genotyping. Sequence analysis of the full-length and partial genomes obtained valuable data on genetic diversity of murine noroviruses. The discordance of genotype affiliation of some MNVs shown in ORF1 and ORF2 suggests intertypic recombination events in vivo.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den